

Aus der Medizinischen Kleintierklinik des Zentrums für Klinische Tiermedizin der
Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Angefertigt unter der Leitung von: Prof. Dr. Katrin Hartmann

Untersuchung zur Diagnose und Prognose der caninen Leishmaniose

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität
München

von
Kathrin Maria Geisweid
aus Würzburg

München 2013

Gedruckt mit der Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Joachim Braun

Referent: Univ.-Prof. Dr. Katrin Hartmann

Korreferent: Univ.-Prof. Dr. Hermann Ammer

Tag der Promotion: 09. Februar 2013

Meinen Eltern und Oliver

In Liebe

INHALTSVERZEICHNIS

I.	EINLEITUNG	1
II.	LITERATURÜBERSICHT: DIE CANINE LEISHMANIOSE	2
1.	Epidemiologie	2
1.1.	Hund als Reservoir	2
1.2.	Entwicklungszyklus	4
1.3.	Übertragung	4
2.	Immunologie	7
2.1.	Th1-assoziierte Immunantwort	8
2.2.	Th2-assoziierte Immunantwort	9
3.	Klinik	10
3.1.	Hautveränderungen	10
3.2.	Lymphadenopathie	11
3.3.	Glomerulonephritis	12
3.4.	Anämie	13
4.	Diagnostik	14
4.1.	Indirekte Nachweisverfahren	14
4.1.1.	Antikörper-Nachweisverfahren	15
4.1.1.1.	Immunofluorescence Assay	16
4.1.1.2.	Enzyme-linked Immunosorbent Assay	17
4.1.2.	Nachweis der zellulären Immunantwort	18
4.1.2.1.	Leishmanin-Skin-Test	19
4.1.2.2.	Lymphozyten-Proliferations-Test	19
4.2.	Direkte Nachweisverfahren	20
4.2.1.	Mikroskopische Untersuchungen	20
4.2.1.1.	Zytologie	21
4.2.1.2.	Histologie	22
4.2.2.	Polymerase-Kettenreaktion	23
5.	Staging	24
6.	Prognose	26
III.	PUBLIKATION	28

IV.	MANUSKRIFT.....	35
V.	DISKUSSION	51
VI.	ZUSAMMENFASSUNG	62
VII.	SUMMARY.....	64
VIII.	LITERATURVERZEICHNIS.....	66
IX.	DANKSAGUNG	86

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

B	B-Zellen
DNA	Desoxy-Ribonucleic-Acid (Desoxyribonukleinsäure)
DTHR	Delayed Type Hypersensitivity Reaction
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
FNA	Feinnadelaspirat
genom. DNA	genomische DNA
HE	Hämatoxilin-Eosin
IFA	Immunofluorescence Assay
IFN- γ	Gamma-Interferon
Ig	Immunglobulin
IL-2	Interleukin-2
IL-4	Interleukin-4
IL-10	Interleukin-10
IL-12	Interleukin-12
IL-27	Interleukin-27
IMH	Immunhistochemie
iNOS	Makrophagen-spezifische Stickstoffmonoxid-Synthase
ITS1	Internal Transcribed Spacer 1
kDNA	Kinetoplasten-DNA
<i>L. chagasi</i>	<i>Leishmania chagasi</i>
<i>L. infantum</i>	<i>Leishmania infantum</i>
LPG	Lipophosphoglykan
LSA	<i>Leishmania</i> Soluble Antigen (lösliches <i>Leishmania</i> Antigen)
LST	Leishmanin-Skin-Test
NO	Stickstoffmonoxid
P	Plasmazelle
PBMC	Peripheral Blood Mononuclear Cells (mononukleäre Zellen des peripheren Bluts)
PCR	Polymerase Chain Reaction (Polymerase Kettenreaktion)
RNA	Ribonucleic-Acid (Ribonukleinsäure)
Sb	Antimon
SI-Index	Stimulationsindex
SYBR Green	asymmetrischer Cyanin-Farbstoff (Summenformel C ₃₂ H ₃₇ N ₄ S)
TGF- β	Transforming-growth-factor-beta
Th	T-Helfer-Zelle
TNF- α	Tumornekrosefaktor-alpha
z. B.	zum Beispiel

I. EINLEITUNG

Leishmaniose ist eine durch Protozoen des Genus *Leishmania* hervorgerufene Infektionskrankheit mit weltweiter Verbreitung. Auf Grund des zunehmenden Imports von Hunden aus dem Ausland und des steigenden Wunsches von Besitzern, ihre Tiere mit in den Urlaub zu nehmen, ist die canine Leishmaniose in Deutschland eine häufig diagnostizierte Importkrankheit (METTLER et al., 2005b).

Die Prognose von infizierten Patienten ist wegen einer Vielzahl möglicher Symptome und labordiagnostischer Veränderungen nur schwer einschätzbar (CIARAMELLA et al., 1997; KOUTINAS et al., 1999). Es ist ein Zusammenhang zwischen der Höhe des Antikörpertiters und dem Auftreten klinischer Symptome beschrieben (ABRANCHES et al., 1991a; PINELLI et al., 1994; CARDOSO et al., 1998). In endemischen Gebieten wird im Moment empfohlen, die Patienten an Hand eines „Stagings“, das sich aus dem Antikörpertiter, klinischen Befunden und Laborparametern zusammensetzt, zu klassifizieren (SOLANO-GALLEGO et al., 2009; PALTRINIERI et al., 2010). Über die prognostische Aussagekraft einzelner Parameter ist jedoch wenig bekannt. In der ersten Studie der Arbeit sollte daher der Einfluss des Antikörpertiters auf die Prognose überprüft und weitere prognostische Parameter gefunden werden. Außerdem sollte die Frage beantwortet werden, ob eine Therapie, obwohl sie nicht zur Erregerfreiheit führt (NOLI & AUXILIA, 2005), in einer Region, in der eine Reinfektion unwahrscheinlich ist, sinnvoll ist.

Die Diagnose einer Leishmaniose wird durch Antikörper-Nachweis oder direkten Erregernachweis gestellt. Die Erreger-DNA kann in vielen Geweben gefunden werden (MAIA et al., 2007). Eine Knochenmarks-PCR gilt auf Grund ihrer hohen Sensitivität als Goldstandard zur Diagnosestellung (ANDRADE et al., 2002). Da eine Knochenmarkspunktion invasiv ist, stellt sich die Frage nach alternativem Probenmaterial. In der zweiten Studie der Arbeit sollte daher die Sensitivität und Spezifität einer PCR aus Konjunktivaltupfern in einem nicht-endemischen Gebiet ermittelt werden.

II. LITERATURÜBERSICHT: DIE CANINE LEISHMANIOSE

1. Epidemiologie

Leishmaniose ist eine durch Protozoen aus dem Genus *Leishmania* (Klasse Kinetoplastida, Familie Trypanosomatidae) hervorgerufene Infektionskrankheit. In der Humanmedizin wird zwischen der kutanen Leishmaniose, die sich auf die Haut und die mukokutanen Übergänge beschränkt, und der viszeralen Leishmaniose, bei der auch die inneren Organe beteiligt sind und die unbehandelt in der Regel tödlich verläuft, unterschieden (MURRAY et al., 2005). Die Erkrankung ist in 98 Ländern der Erde endemisch. Das Ausbreitungsgebiet erstreckt sich über den Mittelmeerraum, Südamerika, Asien und Afrika. Die Zahl der jährlichen Neuerkrankungen beim Menschen wird auf 0,2 - 0,4 Millionen für viszerale Leishmaniose und 0,7 - 1,2 Millionen für kutane Leishmaniose geschätzt. Es versterben jährlich 20.000 - 40.000 Menschen an der Krankheit (ALVAR et al., 2012).

1.1. Hund als Reservoir

Hunde können mit zahlreichen *Leishmania*-Spezies, die beim Menschen eine kutane, mukokutane oder viszerale Leishmaniose auslösen, infiziert sein. Die canine Leishmaniose wird im Mittelmeerraum vor allem durch *Leishmania infantum* (*L. infantum*) und in Süd- und Mittelamerika durch *Leishmania chagasi* (*L. chagasi*) hervorgerufen (DANTAS-TORRES, 2007). Beide Erreger sind genetisch eng miteinander verwandt. Es wird daher vermutet, dass *L. infantum* bei der Besiedelung Südamerikas durch infizierte Hunde europäischer Siedler eingeschleppt wurde und sich anschließend zu *L. chagasi* entwickelte. (TUON et al., 2008). Der Haushund wird als wichtigster Reservoirwirt für *L. infantum* und *L. chagasi* angesehen (GRAMICCIA & GRADONI, 2005). Schätzungen zufolge sind allein in Südeuropa bis zu 2,5 Millionen Hunde mit dem Erreger infiziert (MORENO & ALVAR, 2002). Für andere *Leishmania*-Arten scheint der Hund kein Reservoir zu sein und damit in der Übertragung auf den Menschen keine Rolle zu spielen (DANTAS-TORRES, 2007) (Tabelle 1).

Tabelle 1: Humanmedizinisch wichtige *Leishmania*-Arten, ihre Vektoren und wichtige Reservoir-Wirte

<i>Leishmania</i> Species	Vektor	Geographische Verbreitung	Erkrankung beim Menschen	Übertragung	Wichtige Säugetierwirte
<i>Leishmania (Leishmania) major</i>	<i>Phlebotomus papatasi</i> , <i>Phlebotomus dubosqi</i> , <i>Phlebotomus salahi</i>	Zentral- und Westasien, Nordafrika, Sahelzone, Zentral- und Westafrika	kutane Form (Orientbeule)	ländlich, zoonotisch	Große Wüstenrennmaus (<i>Rhombomys opimus</i>), fette Sandratte (<i>Psammomys obesus</i>)
<i>Leishmania (Leishmania) tropica</i>	<i>Phlebotomus sergenti</i>	Zentral- und Westasien, Nordafrika	kutane Form (Orientbeule)	städtisch, anthroponotisch	Mensch, Fellschliefer (<i>Heterohyrax brucei</i> , <i>Provacia</i> spp.)
<i>Leishmania (Leishmania) aethiopica</i>	<i>Phlebotomus longipes</i> , <i>Phlebotomus pedifer</i>	Äthiopien, Kenia	diffus kutane Form	ländlich, zoonotisch	Fellschliefer (<i>Heterohyrax brucei</i> , <i>Provacia</i> spp.)
<i>Leishmania (Leishmania) donovani</i>	<i>Phlebotomus arentipes</i> , <i>Phlebotomus orientalis</i> , <i>Phlebotomus martini</i>	indischer Subkontinent, Ostafrika	viszerale Form (Kala Azar)	epidemisch, anthroponotisch	Mensch
<i>Leishmania (Leishmania) infantum</i>	<i>Phlebotomus ariasi</i> , <i>Phlebotomus perniciosus</i>	mediterranes Becken, Zentral- und Westasien	infantile, viszerale Form	zoonotisch, peridomestisch	Hund
<i>Leishmania (Leishmania) infantum</i> (syn. <i>chagasi</i>)	<i>Lutzomyia longipalpis</i>	Zentral- und Südamerika	infantile, viszerale Form	zoonotisch, peridomestisch	Hund, Füchse (<i>Lycalopex vetulus</i> , <i>Cercocyon thous</i>)
<i>Leishmania (Leishmania) mexicana</i>	<i>Lutzomyia olmeca olmeca</i>	Zentralamerika	kutane Form (Chiclero's Ulzerationen)	sylvatisch, zoonotisch	Waldnagetiere (<i>Otomyomys phyllotis</i> + andere)
<i>Leishmania (Leishmania) amazonensis</i>	<i>Lutzomyia flaviscutellata</i>	Südamerika	kutane Form	sylvatisch, zoonotisch	Waldnagetiere (<i>Proechimys</i> spp. + andere)
<i>Leishmania (Viannia) braziliensis</i>	<i>Lutzomyia wellcomei</i> , <i>Lutzomyia complexus</i> , <i>Lutzomyia carrerai</i>	Zentral- und Südamerika	kutane, mukokutane Form (Espundia)	sylvatisch, zoonotisch	Waldnagetiere (<i>Akodon</i> spp., <i>Proechimys</i> spp. + andere)
<i>Leishmania (Viannia) peruviana</i>	<i>Lutzomyia peruensis</i> , <i>Lutzomyia verrucarum</i>	Peru	kutane Form (Uta)	hochländisch, zoonotisch	Unbekanntes Reservoir, (Hund?)
<i>Leishmania (Viannia) guyanensis</i>	<i>Lutzomyia umbratilis</i>	Südamerika	kutane Form (oft metastatisch)	sylvatisch, zoonotisch	Faultier (<i>Choloepus didactylus</i>), Ameisenbär (<i>Tamandua tetradactyla</i>)
<i>Leishmania (Viannia) panamensis</i>	<i>Lutzomyia trapidoi</i>	Zentralamerika	kutane Form	sylvatisch, zoonotisch	Faultier (<i>Choloepus hoffmanni</i>)

1.2. Entwicklungszyklus

Leishmania-Spezies haben einen zweiwirtigen Entwicklungszyklus. Die geschlechtliche Fortpflanzung findet im Darmtrakt der als Vektor fungierenden Phlebotomen statt. Ist diese abgeschlossen, gelangt das begeißelte promastigote Parasitenstadium in den Stechrüssel der Sandmücke und wird bei der nächsten Blutmahlzeit auf den Säugetierwirt übertragen. Hunde werden vor allem an wenig behaarten Stellen wie dem Kopf, der Nase, der Innenseite der Ohrmuschel und im inguinalen sowie perianalen Bereich gestochen (ALVAR et al., 2004). Innerhalb weniger Minuten nach der Injektion wird der Parasit durch neutrophile Granulozyten und Makrophagen aufgenommen. Da neutrophile Granulozyten nur eine geringe phagozytotische Kapazität und eine relativ kurze Halbwertszeit haben, findet die Proliferation der Leishmanien hauptsächlich in Makrophagen statt. Nach der Verschmelzung des die Leishmanien enthaltenden Phagosoms mit dem Lysosom, differenziert sich das promastigote in das kleinere, immotile amastigote Parasitenstadium. Der Erreger vermehrt sich anschließend durch mitotische Teilung. Dieser Prozess führt zur Ruptur des infizierten Makrophagen und zur erneuten Infektion von umliegenden phagozytotisch aktiven Zellen (Abbildung 1). Der weitere Verlauf der Infektion hängt stark vom Immunstatus des Wirts ab. Kann der Erreger die unspezifischen Abwehrmechanismen umgehen, kommt es zu einer Ausbreitung im lymphoretikulären Gewebe (LIU & UZONNA, 2012).

1.3. Übertragung

Überträger der caninen Leishmaniose sind Phlebotomen, die auch als Sandfliegen oder Sandmücken bezeichnet werden (Abbildung 2). Es handelt sich um ca. 3 mm große, behaarte Insekten, die vor allem dämmerungs- und nachtaktiv sind. Beide Geschlechter ernähren sich pflanzlich. Nur die fortpflanzungsfähigen Weibchen saugen zusätzlich Blut, das sie zur Eierproduktion benötigen (KILLICK-KENDRICK, 1999). Um eine Blutmahlzeit aufnehmen zu können, erzeugen die Mücken mit ihren sägeartigen Mundwerkzeugen eine oberflächliche Hautwunde, die sich mit Blut aus verletzten Kapillargefäßen füllt. Durch die Gewebsverletzung kommt es zu einer vermehrten Ansammlung von Makrophagen im Wundsekret. Eine Infektion der Sandmücken findet somit hauptsächlich über sich in der Haut befindende Makrophagen statt. Nach Aufnahme der Blutmahlzeit kommt es, begünstigt durch geänderte Umgebungsbedingungen

(niedrigere Temperatur, erhöhter pH-Wert), zur Umwandlung der intrazellulären amastigoten in die promastigote Form (BATES & ROGERS, 2004) (Abbildung 1). Um die Fortpflanzung der Leishmanien zu ermöglichen, muss die promastigote Form fest an die Darmwand der Mücke anhaften (BATES, 2007). Diese Bindung wird vermutlich durch das Lipophosphoglykan (LPG), einem Hauptbestandteil der Zelloberfläche des Parasiten, und einem passenden Enzym- und Ligandenumfeld im Mitteldarm der Sandmücke ermöglicht (TURCO, 1990). Da das LPG zwischen verschiedenen *Leishmania*-Spezies variiert, kommt es nur zur Übertragung von Leishmanien, wenn ein an die jeweilige Spezies adaptierter Vektor vorhanden ist (VOLF et al., 2008). Findet keine Bindung statt, werden die Promastigoten bei der nächsten Defekation mit der verdauten Blutmahlzeit wieder ausgeschieden (KILLICK-KENDRICK, 1985).

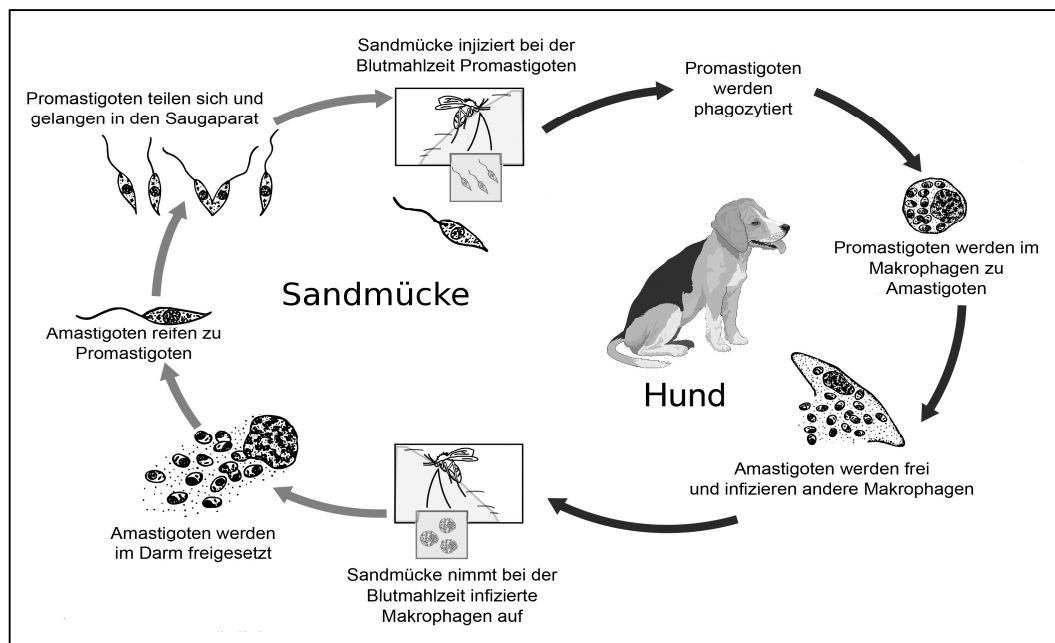


Abbildung 1: Lebenszyklus von *L. infantum* (nach *Leishmania Lifecycle*)

Unterschiedliche Theorien zur Übertragung des promastigoten Parasitenstadiums von Sandmücken auf den Wirbeltierwirt werden diskutiert. Die Inokulationstheorie geht davon aus, dass spezielle promastigote Stadien, die ausschließlich im Saugapparat der Mücke gefunden werden, während der Erzeugung der Hautwunde in das Gewebe des Wirts eingebracht werden (KILLICK-KENDRICK et al., 1977). Auf Grund neuer Studien finden sich im Moment jedoch mehr Hinweise auf die sogenannte „blocked fly hypothesis“: Während des Entwicklungszyklus bildet sich im Darm der Mücke ein gelartiger

Pfropfen, dessen Hauptbestandteil das filamentöse Proteophosphoglycan ist. Darin eingelagert finden sich zahlreiche Promastigoten. Die infektiösen Parasitenstadien werden bei der Blutmahlzeit auf Grund der Obstruktion durch den Gelpfropfen im Mitteldarm der Mücke regurgitiert und so übertragen (ROGERS et al., 2002; ROGERS et al., 2004) (Abbildung 1).

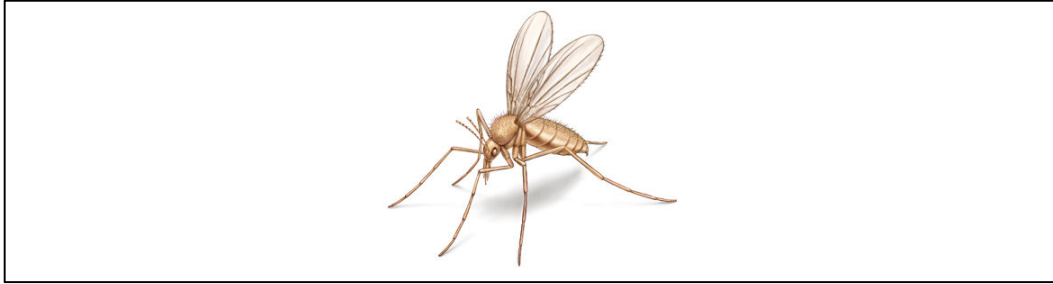


Abbildung 2: Phlebotomus (Sandmücke) (<http://www.guminmyhair.wordpress.com>)

Nicht durch Sandmücken übertragene Infektionen spielen eine untergeordnete Rolle in der Epidemiologie der Leishmaniose. Die Rolle von blutsaugenden Arthropoden, wie Zecken und Flöhen, bei der natürlichen Übertragung der Leishmaniose wurde vielfach untersucht. Die Bedeutung beider Spezies ist jedoch immer noch unklar. In ersten experimentellen Studien konnte sowohl in *Rhipicephalus sanguineus* als auch in Flöhen, die an symptomatischen Hunden gesaugt hatten, *Leishmania*-DNA nachgewiesen werden. Sechs Monate nach der intraperitonealen oder oralen Inokulation eines Mazerats aus infizierten Zecken oder Flöhen konnten bei Hamstern Hinweise auf eine Infektion gefunden werden. Diese Ergebnisse legten eine potentielle Funktion als Vektor nahe (COUTINHO et al., 2005; COUTINHO & LINARDI, 2007). Darüber hinaus wurde bei Zecken und Flöhen, die an infizierten Hunden gesaugt hatten, eine hohe Infektionsrate von 50,0 % bzw. 23,0 % nachgewiesen. Die Überlebensfähigkeit der Leishmanien im Darm von Zecken und Flöhen wurde bestätigt (COLOMBO et al., 2011). In einer neuen Studie wurde vor allem bei männlichen Zecken mittels PCR eine Infektion nachgewiesen (SOLANO-GALLEGGO et al., 2012).

Eine direkte Übertragung von Hund zu Hund wurde in Fallberichten beschrieben. Sie konnte aber noch nicht durch experimentelle Studien belegt werden (DIAZ-ESPINEIRA & SLAPPENDEL, 1997; DUPREY et al., 2006). Eine transplazentale Übertragung von einer infizierten Hündin auf die ungeborenen Welpen ist sowohl nach natürlicher als auch experimenteller Infektion möglich

(ROSYPAL et al., 2005; BOGGIATTO et al., 2011). Auch eine Übertragung durch kontaminierte Blutprodukte wurde dokumentiert (DE FREITAS et al., 2006; TABAR et al., 2008).

2. Immunologie

Das Krankheitsbild der caninen Leishmaniose ist sehr variabel. Während einige Tiere ein Leben lang asymptomatisch bleiben und manche nur wenige Veränderungen zeigen, entwickeln andere eine schwere systemische Erkrankung. Die klinische Ausprägung spiegelt eine Vielzahl möglicher Immunantworten, sowohl angeboren als auch erworben, wieder (CABRAL et al., 1998). Die Bandbreite der Reaktion reicht von einer zellmedierten protektiven Immunität (Th1-assoziiert) bis hin zu einer ausgeprägten humoralen Immunreaktion (Th2-assoziiert), die mit klinischen Symptomen verbunden ist (PINELLI et al., 1994; BARBIERI, 2006). Bei an kutaner Leishmaniose erkrankten Mäusen konnte eine klare Trennung zwischen einem Th1- oder Th2-induzierten Erkrankungsmuster beobachtet werden. Symptomatische Mäuse zeigen eine rein humorale Immunantwort, während asymptomatische Tiere eine rein zelluläre Immunantwort zeigen. Bei erkrankten Hunden ist keine klare Trennung zwischen beiden Mustern erkennbar. Bei allen Hunden finden sich sowohl Hinweise auf eine Th1- wie auch auf eine Th2-medierte Immunantwort (Abbildung 3). Ob infizierte Tiere die Vermehrung der Parasiten kontrollieren können, es zur Heilung kommt oder die Erkrankung fortschreitet, wird durch die unterschiedliche Ausprägung dieser beiden immunologischen Pfade bestimmt (DAY, 2007).

Es ist jedoch noch unklar, warum es zur Ausprägung einer Th1- oder Th2-medierten Immunantwort kommt. Zahlreiche Einflussfaktoren werden diskutiert. So wurde eine Prädisposition für eine klinisch manifeste Leishmaniose beim Boxer, Cockerspaniel, Rottweiler und Deutschen Schäferhund beobachtet. Diese Rassen erkrankten signifikant häufiger als andere (ABRANCHES et al., 1991b; SIDERIS et al., 1999; FRANCA-SILVA et al., 2003). Der Podenco Ibicenco scheint hingegen nur selten Symptome zu entwickeln und eine genetisch bedingte Resistenz zu besitzen (SOLANO-GALLEGO et al., 2000). Mit Hilfe molekular diagnostischer Methoden konnten genetische Einflussfaktoren nachgewiesen werden. Polymorphismen im *Slc11a1*-Gen und einem Allel des Major-Histokompatibilitäts-Komplex II konnten mit einem erhöhten

Erkrankungsrisiko in Verbindung gebracht werden (QUINNELL et al., 2003a; SANCHEZ-ROBERT et al., 2008).

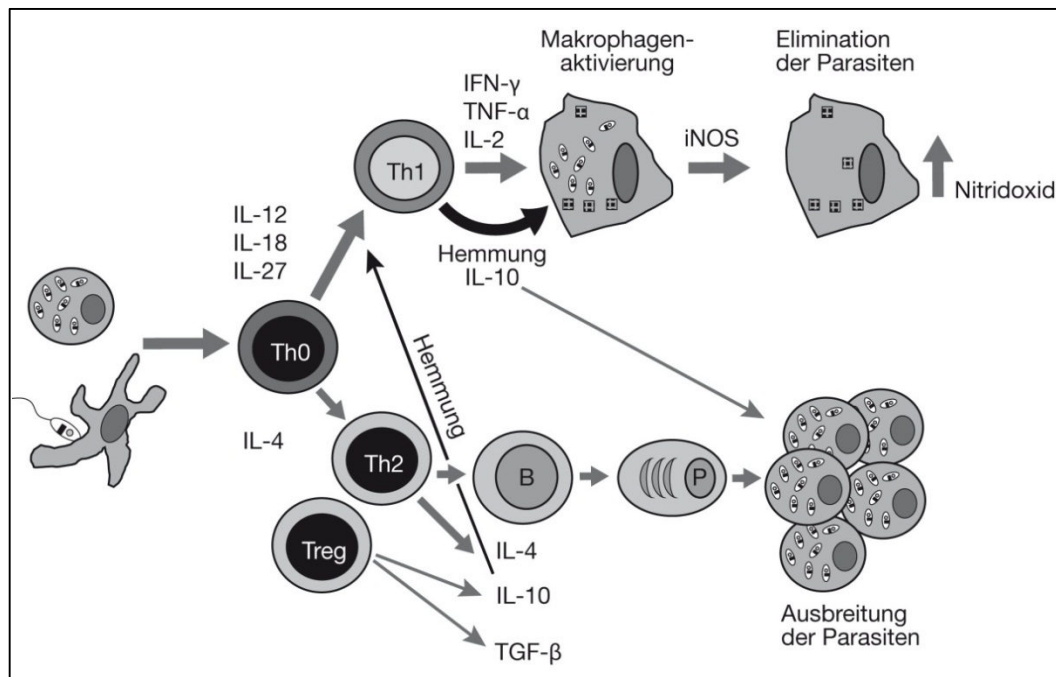


Abbildung 3: Schematische Darstellung der möglichen Immunantwort nach einer *Leishmania*-Infektion nach Baneth et al. (2008), undifferenzierte T-Helfer-Zelle (Th0), T-Helfer-Zelle Subtyp-1 (Th1), T-Helferzelle Subtyp-2 (Th2), regulatorische T-Zelle (Treg), B-Zelle (B), Plasmazelle (P), Interleukin-2 (IL-2), Interleukin-4 (IL-4), Interleukin-10 (IL-10), Interleukin-12 (IL-12), Interleukin-18 (IL-18), Interleukin-27 (IL-27), Gamma-Interferon (IFN-γ), Tumornekrosefaktor-alpha (TNF-α), Transforming-growth-factor-beta (TGF-β), Makrophagen-spezifisches Isoenzym der Stickstoffmonoxid-Synthase (iNOS)

Auch das Alter der Patienten scheint ein wichtiger Einflussfaktor zu sein. Die höchste Prävalenz der Erkrankung wurde bei Hunden unter drei und über acht Jahren beobachtet. (ABRANCHES et al., 1991b; CARDOSO et al., 2004). Bei sehr jungen Tieren hat vermutlich ein noch nicht vollkommen ausgeprägtes Immunsystem einen entscheidenden Einfluss. Bei älteren Tieren spielt wahrscheinlich eine Immunsuppression durch Infektionen mit anderen Erregern oder Begleiterkrankungen, wie Neoplasien oder hormonelle Störungen, eine prädisponierende Rolle (SOLANO-GALLEGO et al., 2009).

2.1. Th1-assozierte Immunantwort

Die protektive Immunität gegen *L. infantum* ist mit einer ausgeprägten CD4⁺-Th1-mediierten, zellulären Immunantwort verbunden. Bei symptomatischen Tieren wird eine reduzierte Anzahl der im peripheren Blut zirkulierenden CD4⁺-

Lymphozyten (GUERRA et al., 2009), sowie eine mangelnde Produktion der mit einer Th1-Antwort-assoziierten Zytokine Gamma-Interferon (IFN- γ) (SARIDOMICHELAKIS, 2009) und Interleukin-2 (IL-2) (PINELLI et al., 1995; PINELLI et al., 1999) beobachtet. Boggiatto et al. (2010) berichten darüber, dass es bei polysymptomatischen Tieren zu einem zunehmenden Anstieg von Interleukin-10 (IL-10) kommt, das zu einer Hemmung der zellulären Immunantwort führt (BOGGIATTO et al., 2010). Lange et al. (2010) wiesen eine Korrelation zwischen der Höhe der Expression von IL-10 durch Zellen der Milz, der im Gewebe parasitierenden Mikroorganismen und dem klinischen Erscheinungsbild nach (LAGE et al., 2007).

Makrophagen spielen bei der Kontrolle der Parasiten eine entscheidende Rolle. Unter dem Einfluss der Zytokine IFN- γ , IL-2 und Tumornekrosefaktor-alpha (TNF- α) kommt es zu einer Induktion des makrophagenspezifischen Isoenzym der Stickstoffmonoxid-Synthase (iNOS) (PINELLI et al., 2000), (VOULDOUKIS et al., 1996). Das Enzym katalysiert die Bildung von Stickstoffmonoxid (NO), welches ein Absterben der intrazellulären Leishmanien bewirkt. Dieses Absterben ist durch umfangreiche Apoptosen der amastigoten Form des Parasiten gekennzeichnet. Der Zelltod wird vor allem durch die Proteasom-Inhibitoren, Lactacystin oder Calpain-Inhibitor-I, gesteuert (HOLZMULLER et al., 2006).

2.2. Th2-assoziierte Immunantwort

Das Auftreten sowie Fortschreiten einer klinischen Erkrankung ist mit der Produktion von Antigen-spezifischen Antikörpern verbunden. Die bei Tieren mit Symptomen gemessenen *Leishmania*-spezifischen Antikörpertiter sind in der Regel höher als die bei asymptomatischen infizierten Tieren (ABRANCHES et al., 1991a; CARDOSO et al., 1998). Im Laufe einer klinischen Erkrankung kommt es zu einem Anstieg der Antikörper der Klassen IgG, IgE und IgA (INIESTA et al., 2005; RODRIGUEZ-CORTES et al., 2007; DE FREITAS et al., 2012). Ein Zusammenhang zwischen der Höhe der Immunglobulinspiegel, dem Gesundheitszustand und der Zahl der im Gewebe nachweisbaren Parasiten wurde dokumentiert (REIS et al., 2006a).

In zahlreichen Studien wurde die Höhe der Immunglobulin-(Ig)G-Subklassen IgG1 und IgG2 untersucht, um einen Zusammenhang zwischen diesen Subklassen, der T-Zell-Antwort und den Folgen einer Infektion zu finden. In

Studien, die polyklonale Antikörper zur Bestimmung der Immunglobuline einsetzten, wurden sehr unterschiedliche Reaktionsmuster der IgG-Subklassen gefunden (DAY, 2007). Deplazes et al. (1995) wiesen initial einen direkten Zusammenhang zwischen dem Anstieg der *Leishmania*-spezifischen IgG1-Antikörper und dem Auftreten klinischer Symptome nach, wohingegen IgG2-Antikörper mit einer asymptomatischen Erkrankung einhergingen (DEPLAZES et al., 1995). Diese These konnte in anderen Studien nicht untermauert werden, die eine klinische Erkrankung mit einem Anstieg der IgG2-Antikörper in Verbindung brachten (SOLANO-GALLEGO et al., 2001b; FERNANDEZ-PEREZ et al., 2003; DE FREITAS et al., 2012).

Durch eine chronische Immunstimulation im Rahmen einer Infektion mit *L. infantum* kann auch die Bildung von Autoantikörpern induziert werden. Außer Antigen-spezifischen Antikörpern konnten auch antinukleäre (LUCENA & GINEL, 1998), antithrombozytäre (TERRAZZANO et al., 2006) und Antikörper gegen Muskelfasern (VAMVAKIDIS et al., 2000) nachgewiesen werden.

3. Klinik

Die canine Leishmaniose ist eine multisystemische Erkrankung. Da zahlreiche Organsysteme betroffen sein können und unterschiedliche Immunreaktionen und verschiedene pathologische Mechanismen beschrieben sind, sind die klinischen Symptome sehr variabel. Klassische Symptome sind Hautveränderungen, generalisierte Lymphadenomegalie, Gewichtsverlust, Muskelatrophie, Leistungsinsuffizienz, Polyurie und Polydypsie, ophthalmologische Veränderungen, Epistaxis, Lahmheit und gastrointestinale Probleme (SLAPPENDEL, 1988; CIARAMELLA et al., 1997; KOUTINAS et al., 1999).

3.1. Hautveränderungen

Eine häufige Manifestation (50,6 %) einer *Leishmania*-Infektion sind Hautveränderungen (KOUTINAS et al., 1999). Unterschiedliche Ausprägungsformen sind beschrieben: eine nicht eitrige exfoliative Dermatitis (56,0 %), die vor allem im Bereich des Kopfes, der Ohren und Gliedmaßen auftritt, eine ulzerative Dermatitis an Knochenvorsprüngen, Pfoten, der Pinna und den mukokutanen Übergängen (40,0 %), eine fokale oder multifokale noduläre und eine papuläre Dermatitis (SOLANO-GALLEGO et al., 2004; ORDEIX et al., 2005; PAPADOGIANNAKIS et al., 2005) und periorbitale (18,0 %) und diffuse

Alopezie (14,0 %) (CIARAMELLA et al., 1997).

Die lokale Entzündungsreaktion der Haut stellt einen unspezifischen Abwehrmechanismus des Wirts dar, der zur Entstehung klinischer Symptome beiträgt. Makrophagen spielen bei dieser Entzündungsreaktion eine wichtige Rolle. In Abhängigkeit des Stimulus und der beteiligten Rezeptoren kann die Aktivierung von Makrophagen zu einem pro- oder anti-inflammatorischen Umfeld beitragen. Apoptosen, die zu einer Aktivierung von Makrophagen führen, scheinen eine Rolle bei der Modulation der Entzündungsreaktion zu spielen. So korreliert die Anzahl der in histologischen Schnitten gefunden Apoptosen gut mit dem Schweregrad der Entzündung und der Zahl der im Gewebe nachgewiesenen Parasiten (VERCOSA et al., 2012).

Histologisch handelt es sich meist um eine pyogranulomatöse Entzündung mit ortho- oder parakeratotischer Hyperkeratose (69,2 %) oder um eine superfizielle perivaskuläre Dermatitis (88,5 %). Die schwersten Veränderungen stellten sich im Bereich der Haarfollikel, um den Isthmus, assoziiert mit dem vaskulären Plexus der Dermis dar. Diese Befunde legen eine hämatogene Verbreitung und einen Hauttropismus des Parasiten nahe (PAPADOGIANNAKIS et al., 2005). Mit zunehmender Schwere der Läsionen und der Gewebszerstörung wurde eine Reorganisation der extrazellulären Matrix, die durch einen Rückgang von Kollagen Typ-1 und eine Zunahme von Kollagen Typ-3 gekennzeichnet war, beschrieben (GIUNCHETTI et al., 2006). Auch in nicht betroffenen Hautarealen von symptomatischen Tieren konnten histologische Veränderungen und eine hohe Anzahl von Mikroorganismen nachgewiesen werden. Es wird daher vermutet, dass die kutane Entzündungsreaktion bereits vor der Entwicklung klinisch sichtbarer Veränderungen eintritt (SOLANO-GALLEGO et al., 2004; PAPADOGIANNAKIS et al., 2005).

3.2. Lymphadenopathie

Leishmanien werden nach der Aufnahme durch Hautmakrophagen hämatogen in zahlreiche lymphoretikuläre Gewebe verbreitet. Auf Grund der chronischen Immunstimulation durch den Erreger kommt es zur lymphoiden Hyperplasie in Kombination mit einer histiozytären Lymphadenitis (MYLONAKIS et al., 2005). Eine generalisierte Lymphadenopathie wird bei 55,9 - 80,0 % der Patienten mit Leishmaniose diagnostiziert (CIARAMELLA et al., 1997; KOUTINAS et al.,

1999; FREITAS et al., 2012).

Die am häufigsten betroffenen Lymphknoten sind die *Lymphonodii cervicales* und *poplitei*. Histologisch wird eine Größenzunahme und eine höhere Anzahl Lymphfollikel im jeweiligen Lymphknoten, sowie eine deutliche Hypertrophie und Hyperplasie der medullären Makrophagen beobachtet (LIMA et al., 2004). In der Milz kommt es zu einer deutlichen Zunahme der Plasmazellpopulation. Die Ursache dieser Hyperplasie, durch die andere Zellreihen ersetzt werden, ist nicht bekannt. Vermutlich spielen die polyklonale B-Zell-Aktivierung sowie die Produktion von Zytokinen und Chemokinen, die zu einer Differenzierung und Retention der Plasmazellen in lymphoiden Organen führen, eine Rolle (SANTANA et al., 2008). Zusätzlich wurden mikrovaskuläre Umbauvorgänge und eine Zunahme retikulärer Fasern der Milz nachgewiesen. Diese strukturellen Veränderungen führen zu einem verlangsamten Blutfluss innerhalb des Organs und begünstigen die Proliferation und Differenzierung von Immunzellen (ALEXANDRE-PIRES et al., 2006). Ein häufiger histologischer Befund ist außerdem eine Perisplenitis, deren Auftreten mit einer vermehrten Ansammlung von infizierten Makrophagen im subkapsulären Gewebe verbunden ist. Es wird vermutet, dass diese Entzündungsreaktion eine Rolle bei der Verbreitung der Parasiten spielt. Die Größenzunahme der Milz prädisponiert für Trauma und mechanischen Stress, der zu einer Entzündungsreaktion beitragen kann (SANTANA et al., 2008).

3.3. Glomerulonephritis

Chronische Glomerulonephritiden sind bei mit *Leishmanien* infizierten Tieren häufig. Labordiagnostische Veränderungen reichen von einer leichten Proteinurie bis hin zum nephrotischen Syndrom oder einem sekundären chronischen Nierenversagen. Eine Azotämie tritt selten auf. Sie entsteht erst sehr spät im Krankheitsverlauf, wenn durch die Proteinurie eine sekundäre tubuläre Schädigung auftritt. Bei Patienten ohne oder mit nur leicht erhöhten Harnstoff- und Kreatininwerten im Blut konnte sowohl ein Rückgang der glomerulären Filtrationsrate als auch eine glomeruläre Hyperfiltration nachgewiesen werden (CORTADELLAS et al., 2008).

Bei an Leishmaniose erkrankten Tieren wurde bei allen untersuchten Patienten eine Glomerulonephritis und bei 78,2 % eine interstitielle Nephritis diagnostiziert

(COSTA et al., 2003). Histologisch traten unterschiedliche Ausprägungsformen von glomerulären Veränderungen auf. Es wurden membranöse, membranproliferative, mesangiale und fokale-segmentale Glomerulonephritiden beschrieben (ZATELLI et al., 2003). Am häufigsten handelte es sich um die membranproliferative oder mesangioproliferative Form (PLEVRAKI et al., 2006). Die membranproliferative Form führt in der Regel zu einer chronischen Niereninsuffizienz. Die mesangioproliferative Form oder eine „minimal change“ Glomerulonephritis gehen meist ohne Azotämie einher (PLEVRAKI et al., 2006).

Sowohl bei natürlichen als auch experimentellen Infektionen mit *Leishmania* spp. kommt es zu einer vermehrten Bildung von Immunkomplexen. Die Ablagerung dieser Komplexe im Glomerulum galt lange Zeit als einziger Pathomechanismus, der zur Entstehung einer Glomerulonephritis bei infizierten Tieren führt. Elektronenmikroskopisch konnten Ablagerungen von Ig-G, Ig-M und C3 sowohl in mesangialen Abschnitten als auch in Kapillarwänden der Glomerula nachgewiesen werden. Auch in der tubulären Basalmembran werden granuläre Immunkomplex-Ablagerungen gefunden (POLI et al., 1991).

In histologischen Präparaten wird aber auch eine deutliche Hyperzellularität des Glomerulums beschrieben, die nicht durch die Ablagerung von Immunkomplexen erklärt werden kann. Neuere Studien belegen, dass eine gestörte Apoptose der mesangialen Zellen und eine entzündliche Infiltration des mesangialen Bereichs mit CD4⁺-Lymphozyten wichtige Bestandteile der Pathogenese der *Leishmania*-assoziierten-Glomerulonephritis sind. In phagozytischen Zellen des mesangialen Gewebes konnte bei fast allen Patienten (98,2 %) *Leishmania*-Antigen nachgewiesen werden. Die Infiltration der betroffenen Areale mit CD4⁺-T-Zellen und die reduzierte Apoptoserate führen zu der Annahme, dass das Antigen zu einer entzündlichen Infiltration des Gewebes und einer Hemmung des physiologischen Zelluntergangs führt (COSTA et al., 2010).

3.4. Anämie

Eine Anämie kann bei einer Vielzahl von symptomatischen Patienten nachgewiesen werden. Möglicher Auslöser, neben einer Knochenmarkssuppression, kann eine reduzierte Erythropoetinproduktion im Rahmen einer chronischen Niereninsuffizienz sein. Bei symptomatischen Tieren sind eine Dysplasie der erythrozytären Reihe und eine vermehrte

Erythrophagozytose beschrieben. Im Knochenmark von Tieren mit einer veränderten Myelopoese wurde eine erhöhte Anzahl Makrophagen gefunden. Möglicherweise kommt es im Rahmen der Immunabwehr zur einer vermehrten Produktion von proapoptotischen Zytokinen, wie IFN- γ und TNF- α , die eine ausschlaggebende Rolle bei der Entstehung einer Myelodysplasie spielen. Die Ursache der erhöhten Erythrophagozytose ist unklar. Es wird eine Überstimulation der Makrophagen diskutiert (FOGLIA MANZILLO et al., 2006). Außerdem kann es zur Bildung von Autoantikörpern gegen Erythrozyten und somit einer immunmedierten Zerstörung und Phagozytose von Erythrozyten, sowohl im Knochenmark als auch im peripheren Blut, kommen (CIARAMELLA et al., 1997). Die Anämie wird häufig durch einen zusätzlichen Blutverlust verstärkt. Nasenbluten, Hämaturie und hämorrhagische Diarrhöe werden durch Gewebsulzera und Veränderung in der primären und sekundären Hämostase ausgelöst. Beitragen können auch reduzierte Thrombozytenzahlen (CORTESE et al., 2009), eine veränderte Thrombozytenaggregation, eine verminderte Aktivität von Gerinnungsfaktoren und eine vermehrte Fibrinolyse (CIARAMELLA et al., 2005). Bei der Entstehung der Epistaxis können zusätzlich eine pyogranulomatöse oder lymphoplasmazelluläre Rhinitis, Vaskulitiden und ein Hyperviskositätssyndrom eine Rolle spielen (PETANIDES et al., 2008).

4. Diagnostik

Da eine Infektion mit *L. infantum* viele klinische und labordiagnostische Veränderungen nach sich ziehen kann, gibt es keine klassischen pathognomischen Veränderungen. Aus diesem Grund sind zur Diagnose Nachweisverfahren notwendig, mit denen der Erreger direkt oder indirekt nachgewiesen werden kann (MAIA & CAMPINO, 2008).

4.1. Indirekte Nachweisverfahren

Mittels sogenannter indirekter Nachweisverfahren wird nicht der Erreger selbst, sondern die Immunreaktion, die dieser beim Wirtstier auslöst, nachgewiesen. Unter den indirekten Nachweisverfahren zur Diagnose der caninen Leishmaniose wird zwischen humoralen Nachweisverfahren und Verfahren zum Nachweis der zellulären Immunantwort unterschieden (MAIA & CAMPINO, 2008).

4.1.1. Antikörper-Nachweisverfahren

Durch Antikörper-Tests, wie den Immunofluorescence Assay (IFA) oder den Enzym-Linked Immunosorbent Assay (ELISA), werden Antigen-spezifische Antikörper nachgewiesen. In experimentellen Studien tritt die Antikörperbildung ein bis drei Monate nach der Infektion auf (MORENO & ALVAR, 2002). Bei natürlichen Infektionen kann es bis zu drei Monate dauern, bis Antikörper gebildet werden (QUINNELL et al., 2003b). In einigen Studien wurde gezeigt, dass bei einzelnen Hunden sogar ein Jahr bis drei Jahre vergehen, bis Antikörper nachweisbar sind (SOLANO-GALLEGO et al., 2005). Daher wird inzwischen davon ausgegangen, dass manche Tiere über mehrere Jahre Antikörper-negativ bleiben oder nie Antikörper bilden. Diese Annahme wird dadurch untermauert, dass in endemischen Gebieten bei 63,0 % der Hunde mittels PCR eine Infektion nachgewiesen werden kann, wohingegen nur 12,0 – 13,0 % Antikörper haben. (SOLANO-GALLEGO et al., 2001c; LEONTIDES et al., 2002).

In der Regel werden quantitative Angaben zur Antikörperkonzentration gemacht und die ermittelten Werte nochmals in Kategorien eingeteilt (negativ, grenzwertig, niedrig positiv, positiv, hoch positiv). Hohe Antikörperkonzentrationen gelten als beweisend für eine *Leishmania*-Infektion. Niedrige Antikörperkonzentrationen können durch falsch positive Tests entstehen. Hier werden weitere diagnostische Schritte empfohlen (Abbildung 4) (SOLANO-GALLEGO et al., 2009).

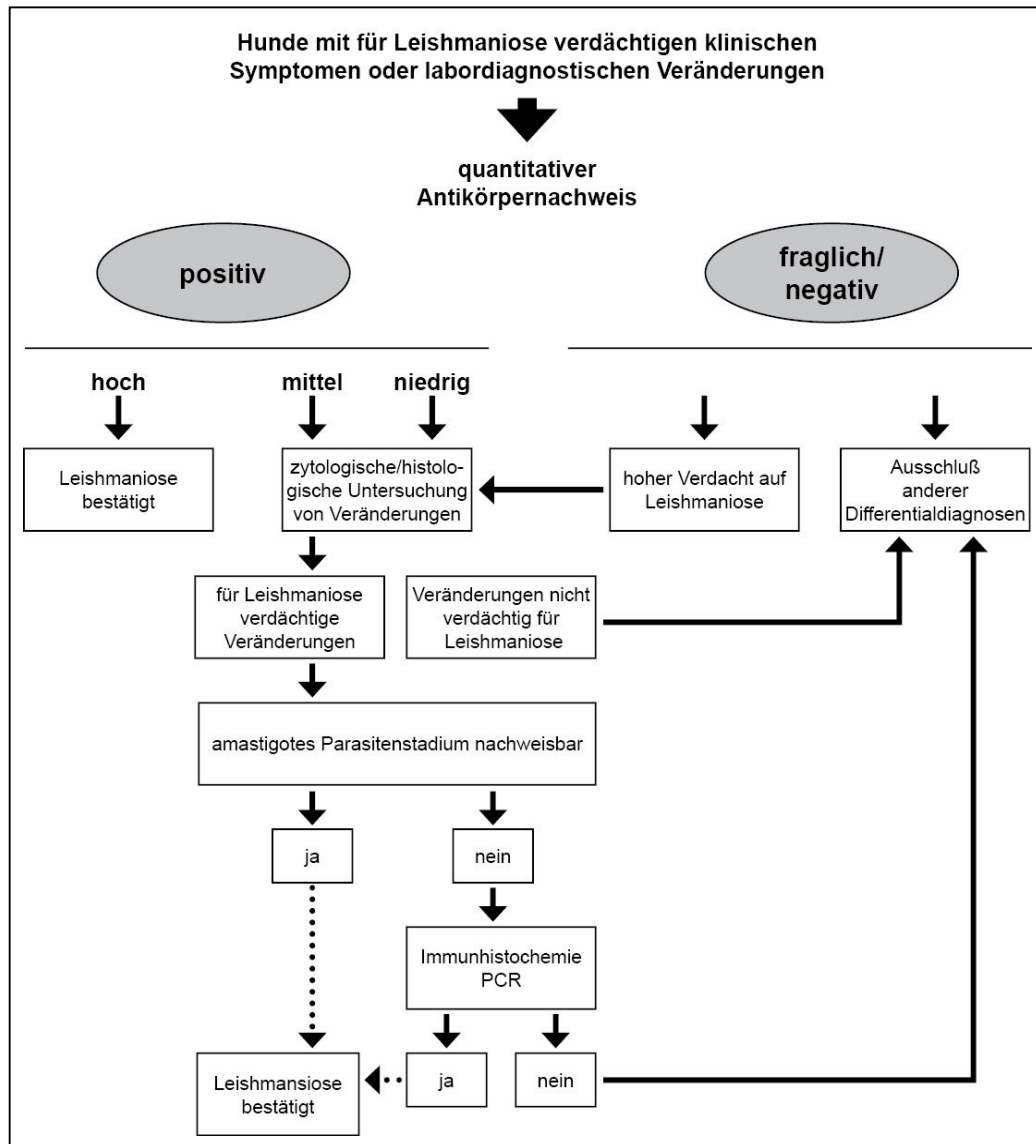


Abbildung 4: Diagnostisches Schema nach Solano-Gallego et al. (2009)

4.1.1.1. Immunofluorescence Assay

Beim Immunfluorescence Assay (IFA) werden Antikörper mit Hilfe einer Immunfluoreszenzreaktion nachgewiesen. In der Regel werden Lysate des ganzen Parasiten als Antigen eingesetzt. Das Ergebnis der gemessenen Antikörperkonzentration wird als Titer angegeben. Als Titer wird die höchste Verdünnung der Probe bezeichnet, bei der die Nachweisreaktion für Antikörper positiv ist. Um eine quantitative Aussage über die Titerhöhe machen zu können, müssen von jeder Serumprobe Verdünnungsreihen angefertigt werden. Der Test ist daher arbeitsaufwendig. Um den Arbeitsaufwand zu reduzieren, sind einige kommerzielle Testkits erhältlich (MAIA & CAMPINO, 2008).

Der IFA ist bei klinisch erkrankten Tieren ein sehr sensitives (Sensitivität 90,0 %) und spezifisches (Spezifität 100 %) Nachweisverfahren. Bei asymptomatischen infizierten Tieren ist die Sensitivität niedriger. Sie liegt hier bei nur 29,4 % (METTLER et al., 2005a) (Tabelle 2). Kreuzreaktionen mit *Trypanosoma cruzi* und anderen *Leishmania*-Spezies sind beschrieben und in für diese Erreger endemischen Regionen häufig. Dies schränkt die Spezifität des Testverfahrens ein, sie wird mit 52,0 % angegeben (FERREIRA EDE et al., 2007).

4.1.1.2. Enzyme-linked Immunosorbent Assay

Beim Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) handelt es sich um ein Nachweisverfahren, welches auf einer enzymatischen Farbreaktion basiert. Die Signalstärke des enzymatisch katalysierten Farbumschlags ist abhängig von der Antikörperkonzentration. Das Ergebnis ist der Wert der optischen Dichte (MAIA & CAMPINO, 2008).

Zum Nachweis spezifischer anti-*Leishmania*-Antikörper können unterschiedliche Antigenaufbereitungen (definierte Peptide, rekombinante Proteine, gereinigte zytoplasmatische Antigene) verwendet werden. Kommen lösliche Antigene des pro- oder amastigoten Parasitenstadiums zum Einsatz, wird die Sensitivität des Tests bei symptomatischen zwischen 88,0 % und 100 % und bei asymptomatischen Tieren zwischen 30,0 % und 100 % angegeben (PORROZZI et al., 2007) (METTLER et al., 2005a) (Tabelle 2). Die Spezifität des ELISA liegt zwischen 64,0% und 96,0% (METTLER et al., 2005a; FERREIRA EDE et al., 2007).

Der Einsatz von löslichen Bestandteilen von pro- und amastigoten *Leishmania*-Stadien kann die Spezifität des ELISA wegen des Auftretens von Kreuzreaktionen mit anderen Antigenen oder *Leishmania* spp. einschränken. Mit Hilfe molekularbiologischer Techniken wurden immunologisch wirksame *Leishmania*-Proteine erzeugt. Diese rekombinanten Antigene kommen heute bei neuen ELISA's zum Einsatz (MAIA & CAMPINO, 2008). Eines dieser Proteine ist das bereits häufig untersuchte rk39, ein repetitives, immundominantes Epitop eines Kinesin-assoziierten Proteins. In Studien konnte eine hohe Sensitivität (100 %) und Spezifität (99.6 %) eines rk39-basierten ELISA bei symptomatischen infizierten Tieren nachgewiesen werden (Tabelle 2) (SCALONE et al., 2002; METTLER et al., 2005a).

Um Seren unterschiedlicher Wirtsspezies mit einem Test untersuchen zu können, wird ein Dot-ELISA mit Peroxidase-markiertem Protein A angewendet. Die Spezifität und Sensitivität lagen in einer Studie im Vergleich zu einem direkten Erregernachweis bei jeweils 100 % (FISA et al., 1997).

Eine Verkürzung der Analysezeit und eine vereinfachte Handhabung, die eine Probenanalyse auch in der Praxis ermöglicht, sollte mit der Entwicklung von Schnelltests erreicht werden. Ein kommerzieller Testkit, beim welchem Vollblut zur Analyse eingesetzt werden kann (Snap[®]CLATK), hatte eine hohe Sensitivität (90,9 %) und Spezifität (100 %) im Vergleich zu Ergebnissen des Western blot (FERROGLIO et al., 2007).

Tabelle 2: Sensitivität Antikörper-basierter Nachweisverfahren

Sensitivität [%]				Literatur
	<i>alle</i>	<i>poly- symptomatisch</i>	<i>oligo- symptomatisch</i>	<i>asymptomatisch</i>
IFA				
	48,5			(OLIVA et al., 2006)
		90,0		29,4 (METTLER et al., 2005a)
	72,0			(FERREIRA EDE et al., 2007)
ELISA				
<i>lösliches Parasitenantigen</i>				
		100		100 (METTLER et al., 2005a)
		87,8	68,0	95,6 (MOREIRA et al., 2007)
	96,0			(FERREIRA EDE et al., 2007)
		88,0		30 (PORROZZI et al., 2007)
ELISA				
<i>rekombinante Antigene</i>				
		100		64,7 (METTLER et al., 2005a)
<i>rk 39</i>		99,4		(SCALONE et al., 2002)
		100		66,0 (PORROZZI et al., 2007)
<i>rk 26</i>		94,0		66,0 (PORROZZI et al., 2007)
<i>rA2</i>		70,0		88,0 (PORROZZI et al., 2007)

4.1.2. Nachweis der zellulären Immunantwort

Obwohl eine ausgeprägte zelluläre Immunantwort die Grundlage einer protektiven Immunität gegen das Auftreten einer Erkrankung ist (CABRAL et al., 1992; PINELLI et al., 1994), sind die Methoden zum Nachweis wenig standardisiert und werden nur selten zur Routinediagnostik eingesetzt. Die beiden wichtigsten Tests sind der sogenannte Leishmanin-Skin-Test und der Lymphozytenproliferationstest (MAIA & CAMPINO, 2008).

4.1.2.1. Leishmanin-Skin-Test

Der am längsten bekannte Test zur Diagnose der Leishmaniose ist der Leishmanin-Skin-Test (LST) oder auch Montenegro-Test, der eine Überempfindlichkeitsreaktion vom Spättyp (delayed type hypersensitivity reaction, DTHR) gegen ein intradermal appliziertes *Leishmania*-Antigen nachweist. Dem Patienten wird hierzu eine Lösung aus verdünnten inaktivierten promastigoten Parasitenstadien, das sogenannte Leishmanin ($3 \times 10^6/\text{ml}$ - $3 \times 10^8/\text{ml}$) unter die Haut gespritzt. Bildet sich nach 48 oder 72 Stunden eine Schwellung, deren Durchmesser größer als 5 mm ist, wird der Test als positiv bewertet (PINELLI et al., 1994; CARDOSO et al., 1998; SOLANO-GALLEG0 et al., 2001a). Bei symptomatischen Tieren ist der Test in der Regel negativ, während asymptomatisch infizierte Patienten oder Patienten nach einer erfolgreichen Therapie positiv reagieren (PEARSON & SOUSA, 1996). Der Test wird vor allem in Screeninguntersuchungen zum Nachweis der zellulären Immunantwort bei klinisch gesunden Patienten oder zur Therapiekontrolle eingesetzt (SOLANO-GALLEG0 et al., 2005). In der Humanmedizin ist nach mehrmaliger Applikation eine Immunisierung gegen das injizierte Leishmanin beschrieben, die ein falsch positives Testergebnis auslösen kann (NASCIMENTO et al., 1993; JOSE et al., 2001). Der LST ist ein einfach durchzuführendes und kostengünstiges Testverfahren. Der hohe Zeitaufwand, der sich durch die lange Nachuntersuchungszeit von 72 Stunden ergibt und durch mehrmaliges Testen hervorgerufene, falsch positive Reaktionen schränken die Nutzbarkeit der LST aber deutlich ein (FERNANDEZ-BELLON et al., 2005). Studien zur Sensitivität und Spezifität im Vergleich zu anderen Verfahren gibt es nicht.

4.1.2.2. Lymphozyten-Proliferations-Test

Bei diesem Verfahren handelt es sich um einen *in-vitro*-Nachweis der zellulären Immunantwort. Aus einer peripheren Blutprobe werden mononukleäre Zellen (PBMC) isoliert und anschließend mit einem löslichen *Leishmania*-Antigen (LSA) und einem Mitogen inkubiert. Das Maß der Zellproliferation wird durch den sogenannten Stimulationsindex (SI-Index) wiedergegeben, der sich aus dem Quotienten der stimulierten zu den nicht-stimulierten Zellen ergibt. In der Literatur werden SI-Indices höher als 2 (PINELLI et al., 1994), 2,5 (CABRAL et al., 1992; CABRAL et al., 1998) 3 (LEANDRO et al., 2001) oder 5 (QUINNELL et al., 2001) als positiv erachtet.

Bei asymptomatischen infizierten Tieren wird eine starke Proliferation der durch LSA stimulierten Zellen beobachtet, symptomatische Tiere haben ein negatives Testresultat (ABRANCHES et al., 1991a; PINELLI et al., 1994). Nach einer erfolgreichen Therapie symptomatischer Tiere (die Tiere zeigten keine klinischen Symptome mehr) nimmt die Proliferation der mit LSA stimulierten PBMC wieder zu (MORENO et al., 1999; RHALEM et al., 1999; FERNANDEZ-PEREZ et al., 2003). Der Lymphozyten-Proliferations-Test ist allerdings kein sensitives Nachweisverfahren zur Diagnose einer *Leishmania*-Infektion. Bei Hunden mit einem positiven direkten Erregernachweis lag die Sensitivität nur bei 68,0 %. Eine mögliche Ursache hierfür sind schlechte Lebensbedingungen und ein reduzierter Ernährungszustand der untersuchten Population, die zu einer reduzierten zellulären Immunantwort geführt haben könnten. Auch die Spezifität des Nachweisverfahrens ist niedrig, von 30 nicht infizierten Kontrolltieren reagierten fünf falsch positiv (QUINNELL et al., 2001).

4.2. Direkte Nachweisverfahren

Beim direkten Erregernachweis kann entweder mittels einer mikroskopischen Untersuchung der Erreger selbst oder durch eine Polymerase Chain Reaction (PCR) die Erreger-DNA nachgewiesen werden (SOLANO-GALLEGO et al., 2009).

4.2.1. Mikroskopische Untersuchungen

Die Diagnose „Leishmaniose“ wird oft durch den zytologischen oder histologischen Nachweis des amastigoten Parasitenstadiums in infiziertem Gewebe, z.B. Knochenmark, Lymphknoten, Haut und peripherem Blut, gestellt. Die Parasiten, die entweder frei oder intrazellulär in Monozyten oder Makrophagen liegen, stellen sich als 2 - 5 µm große runde oder ovale Organismen dar. Typisch ist ein relativ großer exzentrischer Kern und, der im rechten Winkel dazu liegende, sich dunkler färbende Kinetoplast (MAIA & CAMPINO, 2008) (Abbildung 5).

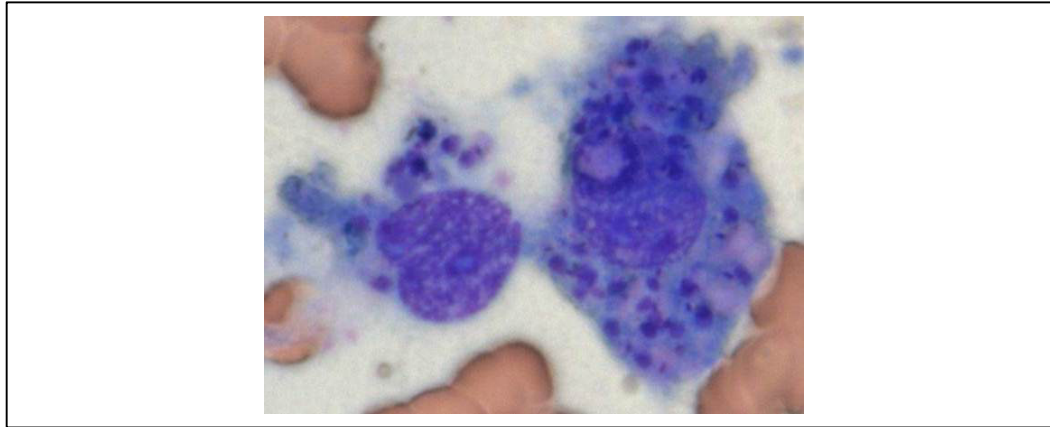


Abbildung 5: Amastigotes Parasitenstadium im Makrophagen (Photo: Medizinische Kleintierklinik)

Die Spezifität mikroskopischer Untersuchungen liegt bei nahezu 100 %. Artefakte können selten fälschlicherweise als Leishmanien angesehen werden (BANETH & AROCH, 2008). Die Sensitivität des Verfahrens hängt jedoch stark von der Erfahrung des jeweiligen Untersuchers ab. Eine geringe Sensitivität wird vor allem bei Proben mit einer nur sehr geringen Anzahl an amastigoten Parasitenstadien beobachtet (CHULAY & BRYCESON, 1983).

4.2.1.1. Zytologie

Eine schnelle und kostengünstige Methode zum direkten Erregernachweis ist die mikroskopische Untersuchung von nach Wright's, Gimsa oder Leishman gefärbten Feinnadelaspiraten (FNA) unter Ölimmersion. Die Sensitivität der Untersuchungsmethode ist sehr variabel (Tabelle 3). Sie hängt stark von der Dichte der Parasiten in klinischen Proben, dem untersuchten Material und der untersuchten Patientengruppe ab. Ciaramella et al. (1997) fanden eine Sensitivität von 88,6 % (CIARAMELLA et al., 1997) bei symptomatischen Tieren, wohingegen die Sensitivität bei asymptomatischen Hunden nur bei 39,1 % (MOREIRA et al., 2007) lag. Durch eine längere Untersuchungszeit und bei einer erhöhten Anzahl an untersuchten Gesichtsfeldern konnte die Sensitivität auf 94,8 % in Lymphknoten und Knochenmarksproben symptomatischer Tiere gesteigert werden (SARIDOMICHELAKIS et al., 2005).

Tabelle 3: Sensitivität der zytologischen Untersuchung von Gewebeproben

	Sensitivität [%]				Literatur
	<i>alle</i>	<i>poly-symptomatisch</i>	<i>oligo-symptomatisch</i>	<i>asymptomatisch</i>	
Knochenmark	51,0				(OLIVA et al., 2006)
				7,8	(SARIDOMICHELAKIS et al., 2005)
Lymphknoten		75,6	32,0	39,1	(MOREIRA et al., 2007)
Lymphknoten und Knochenmark		88,9			(CIARAMELLA et al., 1997)
		94,7			(SARIDOMICHELAKIS et al., 2005)

4.2.1.2. Histologie

In Hämatoxilin-Eosin (HE) gefärbten Biopsieproben kann der Erreger mikroskopisch nachgewiesen werden. Meist werden Lymphknoten-, Knochenmarks- und Hautbiopsien untersucht. Die Sensitivität ist jedoch gering (MOREIRA et al., 2007) (Tabelle 4).

Tabelle 4: Sensitivität der histologischen Untersuchung von Hämatoxilin-Eosin- (HE)-gefärbten Gewebeproben im Vergleich zur Immunhistochemie (IMH)

		Sensitivität [%]			Literatur
		<i>poly-symptomatisch</i>	<i>oligo-symptomatisch</i>	<i>asymptomatisch</i>	
Lymphknoten	HE	43,9	40,0	39,1	(MOREIRA et al., 2007)
	IMH	65,8	68,0	72,7	
Milz	HE	43,9	40,0	38,1	
	IMH	60,9	64,0	69,5	
Knochenmark	HE	26,8	12,0	21,7	
	IMH	58,5	32,0	47,8	
Leber	HE	26,8	12,0	13,4	
	IMH	53,6	40,0	56,5	
Haut	HE	44,8			(XAVIER et al., 2006)
	IMH	62,1			

Zusätzlich werden immunhistochemische Verfahren eingesetzt, um die Sensitivität des Verfahrens zu erhöhen. Dies ist vor allem bei Proben mit einer geringen Leishmaniendichte sinnvoll. Zum immunhistochemischen Nachweis der Parasiten wird ein Streptavidin/Peroxidase-Biotin-System unter Verwendung eines caninen Hyperimmunserums oder poly- oder monoklonaler anti-*Leishmania*-Antikörper eingesetzt (BOURDOISEAU et al., 1997b; TAFURI et al., 2004). Die Sensitivität des histologischen Erregernachweises erhöht sich so auf 62,1 % bei Hautbiopsien (XAVIER et al., 2006) und 92,7 % bei

Lymphknotenbiopsien von symptomatischen Tieren (MOREIRA et al., 2007).

4.2.2. Polymerase-Kettenreaktion

Die PCR ist ein weiteres Verfahren zum Erregernachweis. Die für die PCR benötigte DNA kann aus Blut (FISA et al., 2001; LACHAUD et al., 2002b), zahlreichen Geweben (SOLANO-GALLEG0 et al., 2001c; ANDRADE et al., 2002; REITHINGER et al., 2002), Körperflüssigkeiten (FRANCESCHI et al., 2007) und auch aus bereits fixierten histologischen Proben (XAVIER et al., 2006) isoliert werden. Auch Konjunktivaltupfer, die wenig invasiv gewonnen werden können, können zur Diagnosestellung verwendet werden (STRAUSS-AYALI et al., 2004; FERREIRA SDE et al., 2008; LEITE et al., 2010).

Studien zur Sensitivität ergaben unterschiedliche und manchmal widersprüchliche Resultate (SOLANO-GALLEG0 et al., 2009) (Tabelle 5). Die Sensitivität wird von Faktoren, wie dem PCR-Protokoll, den ausgewählten Primern, der Art der DNA Isolation und dem untersuchten Gewebe beeinflusst (BANETH & AROCH, 2008). Je nach Primer liegt die zu amplifizierende DNA-Sequenz im Leishmaniengenom in unterschiedlicher Kopienzahl vor. Während die „internal-transcribed-spacer-1“- (ITS1-)Region der ribosomalen RNA in nur 40-200-facher Kopie vorliegt, liegt die Minicircle-Sequenz der Kinetoplasten- DNA (kDNA) in 10.000-facher Kopie vor (GOMES et al., 2008) (Tabelle 5).

Die quantitative real-time-PCR ermöglicht eine kontinuierliche Messung der gebildeten DNA-Sequenzen. In der exponentiellen Phase der PCR ist mit Hilfe einer Fluoreszenzmessung die Bestimmung der DNA-Menge im Template möglich. Somit können Rückschlüsse auf die Parasitenzahl in der jeweiligen Probe gezogen werden. Eine Vielzahl von Protokollen zur Quantifizierung der amplifizierten PCR-Produkte aus Gewebeproben von Mäusen, Menschen und Hunden sind beschrieben. Am gebräuchlichsten ist der Einsatz von SYBR-Green, einem unspezifischen fluoreszierenden Farbstoff, der sich in die DNA einlagert (NICOLAS et al., 2002; ROLAO et al., 2004). Vorteile der real-time-PCR gegenüber der konventionellen PCR sind eine verkürzte Untersuchungszeit und ein reduziertes Kontaminationsrisiko (ROLAO et al., 2004; VITALE et al., 2004). Das Verfahren eignet sich gut zur Kontrolle und Überwachung während und nach einer Therapie des Patienten, da es bei einem Ansprechen auf die Medikation zu

einem Rückgang der im Gewebe nachweisbaren Parasiten kommt (PENNISI et al., 2005; MANNA et al., 2008).

Tabelle 5: Sensitivität der PCR unter Berücksichtigung verschiedener Gewebe und Primer, kinetoplasten DNA (kDNA), genomische DNA (genom. DNA)

Material	Primer	Sensitivität [%]			Literatur
		<i>alle</i>	<i>symptomatisch</i>	<i>asymptomatisch</i>	
Knochenmark	kDNA		68,0		(QUINNELL et al., 2001)
			77,5		(DE ALMEIDA FERREIRA et al., 2012)
			100		(LACHAUD et al., 2002a)
				50,0	(DE ALMEIDA FERREIRA et al., 2012)
	genom. DNA	100			(ANDRADE et al., 2002)
Lymphknoten	kDNA		95,4		(LACHAUD et al., 2002a)
			100		(LACHAUD et al., 2002a)
				95,6	(MOREIRA et al., 2007)
	genom. DNA		95,4		(LACHAUD et al., 2002a)
Blut	kDNA		27,5		(DE ALMEIDA FERREIRA et al., 2012)
			100		(LACHAUD et al., 2002b)
				22,5	(DE ALMEIDA FERREIRA et al., 2012)
				65,2	(LACHAUD et al., 2002b)
			75,0		(SILVA et al., 2001)
	genom. DNA		17,0		(STRAUSS-AYALI et al., 2004)
Haut	kDNA		81,8		(LACHAUD et al., 2002b)
			75,0		(DE ALMEIDA FERREIRA et al., 2012)
			97,6		(LACHAUD et al., 2002a)
	genom. DNA			54,0	(DE ALMEIDA FERREIRA et al., 2012)
Hautgeschabsel	kDNA		82,0		(LACHAUD et al., 2002a)
			100		(LACHAUD et al., 2002a)
	genom. DNA		65,0		(STRAUSS-AYALI et al., 2004)
Milz	genom. DNA		73,3		(LACHAUD et al., 2002a)
		71,4			(ANDRADE et al., 2002)
Leber	genom. DNA	66,6			(ANDRADE et al., 2002)
Konjunktival- tupfer	kDNA		95,0		(DE ALMEIDA FERREIRA et al., 2012)
			95,6		(PILATTI et al., 2009)
			77,8		(DI MUCCIO et al., 2012)
				84,2	(DI MUCCIO et al., 2012)
				90,0	(LEITE et al., 2010)
	genom. DNA		73,9		(FERREIRA SDE et al., 2008)
			79,3		(PILATTI et al., 2009)
			92,0		(STRAUSS-AYALI et al., 2004)

5. Staging

Um die Wirksamkeit verschiedener Therapieschemata innerhalb großer Patientengruppen zu beurteilen, die wirksamste Therapie für einen individuellen Patienten auszuwählen und die Prognose einschätzen zu können, wird empfohlen, die Patienten je nach Ausprägung klinischer und labordiagnostischer Veränderungen sowie Ergebnissen diagnostischer Methoden, z. B. Antikörpertiter, in Gruppen einzuteilen. Bei jedem Patienten sollten neben den

spezifischen Untersuchungen zur Diagnosestellung (direkter und/oder indirekter Erregernachweis) eine klinische Untersuchung, ein Blutbild mit Differentialblutbild, ein komplettes Serumorganprofil und eine Urinuntersuchung, inklusive Urin-Protein-Kreatin-Quotient, durchgeführt werden. In der Literatur sind unterschiedliche Klassifikationen beschrieben (SOLANO-GALLEGO et al., 2009; OLIVA et al., 2010).

Nach Oliva et al. (2010) werden die Patienten an Hand des indirekten oder direkten Erregernachweises und der klinischen Symptomatik eingeteilt: (A) Hunde mit Erregerkontakt (negativer direkter Erregernachweis, niedriger Antikörpertiter, keine klinischen Symptome), (B) infizierte Hunde (positiver direkter Erregernachweis, niedriger Antikörpertiter, keine klinischen Symptome), (C) erkrankte Hunde (positiver direkter Erregernachweis und/oder hoher Antikörpertiter, klinische Symptome), (D) schwer erkrankte Hunde (zahlreiche klinische Symptome einer caninen Leishmaniose). Tiere in Stadium A benötigen keine Therapie. Kommt es bei Hunden in Stadium B zu einem Anstieg des Antikörpertiters, ist eine Therapie indiziert; findet jedoch kein Anstieg statt, kann auf eine Therapie verzichtet werden. Patienten in Stadium C und D sollten in jedem Fall gegen eine *Leishmania*-Infektion therapiert werden. Je nach klinischer Symptomatik ist zusätzlich eine unterstützende Therapie notwendig (OLIVA et al., 2010) (Tabelle 6).

Tabelle 6: Staging nach Oliva et al. (2010)

Stadium	Diagnostische Tests	Klinik	Therapie
(A) Hunde mit Erregerkontakt	negativer direkter Erregernachweis, niedriger Antikörpertiter	keine klinischen Symptome	keine Therapie
(B) infizierte Hunde	positiver direkter Erregernachweis, niedriger Antikörpertiter	keine klinischen Symptome	Antikörpertiter stabil → keine Therapie Antikörpertiteranstieg → Therapie
(C) erkrankte Hunde	positiver direkter Erregernachweis und/oder hoher Antikörpertiter	klinische Symptome	Therapie, ggf. unterstützende Therapie notwendig
(D) schwer erkrankte Hunde	siehe Stadium C	zahlreiche Symptome	Therapie ggf. unterstützende Therapie notwendig

6. Prognose

Da eine Vielzahl von klinischen Symptomen und labordiagnostischen Veränderungen vorkommen, ist es schwierig die Prognose eines individuellen Patienten einzuschätzen. Die Prognose ist je nach klinischem Zustand und bereits aufgetretenen organischen Veränderungen variabel und reicht von gut bei milden Veränderungen bis schlecht bei einer hochgradigen Erkrankung (SOLANO-GALLEGO et al., 2009) (Tabelle 7).

Es wurde vermutet, dass die Höhe der Antikörperkonzentration im direkten Zusammenhang zur Prognose steht. Diese Annahme basiert vor allem auf der Tatsache, dass erkrankte Tiere eine hauptsächlich humorale, aber nur eine schwache zelluläre Immunität entwickeln (BARBIERI, 2006). Bei symptomatischen Tieren wurden höhere Antikörperkonzentrationen nachgewiesen als bei asymptomatisch infizierten (ABRANCHES et al., 1991a; CARDOSO et al., 1998). Außerdem wurde berichtet, dass eine Korrelation zwischen der Höhe der Antikörperkonzentration und dem Fortschreiten der Erkrankung besteht (REIS et al., 2006a).

In wie weit der Antikörpertiter alleine zu Beurteilung der Prognose nach einer Therapie genutzt werden kann, ist umstritten. In ersten Studien konnte kein Absinken der Antikörperkonzentration während und nach einer Therapie mit Meglumin-Antimonat beobachtet werden (FERRER et al., 1995). In neueren Studien wurde jedoch ein langsamer und progressiver Rückgang der Konzentration von Ig-G- und Ig-A-Antikörpern bei Patienten, die unter Therapie eine klinische Verbesserung zeigten, beschrieben. Bei Patienten, die nicht auf eine Therapie ansprachen, blieb der Antikörpertiter dagegen konstant (SOLANO-GALLEGO et al., 2001b; RODRIGUEZ et al., 2006).

Neue Untersuchungsmethoden stellen zusätzliche Hilfsmittel zur Abschätzung der Prognose dar. Das Risiko von subklinisch infizierten Hunden, eine klinische Erkrankung zu entwickeln, kann durch den Einsatz einer quantitativen real-time PCR abgeschätzt werden. Tiere, bei denen nur eine geringe Anzahl an Erregern gefunden wird, haben demnach ein geringes Risiko zu erkranken, wohingegen Patienten mit einer hohen Erregerlast wahrscheinlich Symptome entwickeln (ROLAO et al., 2004; FRANCINO et al., 2006). Um die Prognose eines Patienten im klinischen Umfeld zu beurteilen, sollte bei jedem Patienten ein klinisches

„Staging“ durchgeführt werden (SOLANO-GALLEGO et al., 2009) (siehe Kapitel 5).

Tabelle 7: Staging zur Ermittlung der Prognose nach Solano-Gallego et al. (2009)

Klinisches Stadium	Antikörper-titerhöhe	Klinik	Labor	Prognose
Stadium 1: mild	niedrig	Hunde mit milden klinischen Symptomen: periphere Lymphadenopathie, papulöse Dermatitis	keine bis milde labordiagnostische Auffälligkeiten normales Nierenprofil, (Kreatinin < 1,4 mg/dl), keine Proteinurie (UPC < 0,5)	gut
Stadium 2: moderat	niedrig bis hoch positiv	Hunde können neben den in Stadium 1 aufgelisteten folgende Symptome zeigen: diffuse oder symmetrische exfoliative Dermatitis, Onychogryposis, Ulzerationen, Anorexie, Gewichtsverlust, Fieber, Epistaxis	milde nicht regenerative Anämie, Hypergammaglobulinämie, Hypoalbuminämie, Hyperviskositätssyndrom, milde Proteinurie (UPC = 0,5 – 1)	gut bis vorsichtig
Stadium 3: schwer	positiv bis hoch positiv	Hunde können neben den in Stadium 1 und 2 aufgelisteten Symptomen Veränderungen aufgrund von Immunkomplexablagerungen zeigen: Vaskulitis, Arthritis, Uveitis, Glomerulonephritis	neben den in Stadium 2 aufgeführten Veränderungen: chronisches Nierenversagen (IRIS Stage 1 Kreatinin < 1,4 mg/dl UPC > 1 oder IRIS Stage 2 Kreatinin = 1,4 - 2 mg/kg)	vorsichtig bis schlecht
Stadium 4: hochgradig	positiv bis hoch positiv	Hunde, die Symptome aus Stadium 3 zeigen und zusätzlich: pulmonäre Thrombembolie, nephrotisches Syndrom, terminale Nierenerkrankung	Neben den in Stadium 2 aufgeführten Veränderungen: chronisches Nierenversagen (IRIS Stage 3 Kreatinin = 2 -5 mg/kg oder IRIS Stage 4 Kreatinin > 5 mg/kg) nephrotisches Syndrom hochgradige Proteinurie UPC > 5)	schlecht

III. PUBLIKATION

Prognostic analytes in dogs with *Leishmania infantum* infection living in a non-endemic area

K. Geisweid¹

C. Sauter-Louis, DrMedVet, PhD, DipECVPH²

R. Mueller, DrMedVet, DrHabil, DipECVD + ACVD (Dermatology)¹

K. Hartmann, DrMedVet, DrHabil, DipECVIM-CA¹

1) Clinic of Small Animal Medicine, LMU University of Munich, Germany

2) Clinic for Ruminants with Ambulatory Clinic and Herd Health Management, LMU University of Munich, Germany

Veterinary Record, veröffentlicht

Veterinary Record (August 2012) doi: 10.1136/vr.100637

Papers

Prognostic analytes in dogs with *Leishmania infantum* infection living in a non-endemic area

K. Geisweid, R. Mueller, C. Sauter-Louis, K. Hartmann

Due to increasing numbers of dogs that are imported from, or have been visiting Mediterranean countries, canine leishmaniasis has become a very important infectious disease in Germany. The aim of this study was to determine which laboratory and clinical parameters can be used as prognostic factors, whether level of antibody titre is a prognostic factor, and whether treatment leads to a better prognosis in a country in which reinfection is extremely unlikely. Data of 72 dogs infected with *Leishmania infantum* that had been presented to the Clinic of Small Animal Medicine of the LMU University of Munich, Germany, and whose owners answered a detailed questionnaire, were reviewed retrospectively. All dogs included in the study had clinical signs compatible with canine leishmaniasis. No correlation between the level of antibody titres (carried out by immunofluorescence assay) and survival time was found ($p=0.982$). However, there was a significant correlation between survival time and presence of proteinuria ($p<0.001$), hypoalbuminemia ($p=0.002$), and lymphopenia ($p=0.040$) in all treated dogs. Furthermore, treatment of diseased dogs resulted in a longer survival time ($p=0.003$). In conclusion, levels of antibody titres did not correlate with prognosis. More useful parameters to predict shorter survival were proteinuria, hypoalbuminemia and lymphopenia. Also, treatment was correlated with a longer survival of almost two years.

Introduction

Leishmaniasis is a systemic disease with zoonotic potential caused by the intracellular protozoan parasite *Leishmania infantum* or *chagasi*. The infection occurs endemically in regions of the Mediterranean basin, Africa, Asia and South America. The parasite is transmitted by the bite of female sandflies of the genus *Phlebotomus* (in the Old World), or *Lutzomyia* (in the New World). Dogs are considered to be the main reservoir for the parasite (Alvar and others 2004, Baneth and others 2008). Due to increasing numbers of dogs that are imported from, or have been visiting endemic countries, leishmaniasis is now also frequently diagnosed in non-endemic countries. In Germany, where almost no natural transmission occurs, as the environmental conditions prevent the viability of the vector (Teske and others 2002, Shaw and others 2003), it has become an important infectious disease in dogs with a history of travelling (Mettler and others 2005).

Leishmaniasis is a multisystemic disease. A variety of disease patterns and laboratory alterations have been described (Ciaranella and others 1997, Koutinas and others 1999), and therefore, prognosis for an individual patient is difficult to assess. It has been assumed that

prognosis is directly associated with the level of antibody titres. This is based on the fact that animals susceptible to the disease show a mainly humoral, but only a weak cellular immune response (Barbieri 2006). Furthermore, sick dogs have been found to have higher anti-*Leishmania* antibodies than infected asymptomatic ones (Abranches and others 1991a, Cardoso and others 1998). In former studies, there was also evidence of a positive correlation between level of antibody titres and disease progression (Pinelli and others 1994). In addition to anti-*Leishmania* antibody titres in assessment of prognosis, it has currently been recommended to grade the patients based on a clinical staging score that evaluates patients according to a variety of clinical signs and laboratory abnormalities (Paltrinieri and others 2010). However, there is little information about distinct parameters influencing outcome of canine leishmaniasis.

Therefore, the objective of this study was to determine the prognostic value of different clinical and laboratory parameters, including the level of antibody titre in a non-endemic country in which reinfection is unlikely. Additionally, it will be evaluated if patients infected with *L. infantum* in a non-endemic country benefit from treatment.

Materials and methods

Patients

Medical records of 72 *L. infantum*-infected dogs that had been presented to the Clinic of Small Animal Internal Medicine of the LMU University of Munich, Germany, in the years 2000–2008 were reviewed retrospectively (study end point December 31, 2008). Inclusion criterion was an infection with *L. infantum*. Infection was proven either by direct detection of the parasite by PCR (blood, bone-marrow, skin) and/or cytology (fine needle aspirates of lymphnodes, bone marrow, skin) and/or by indirect detection of antibodies (immunoglobulin G) using an immunofluorescence assay. Cut-off titres were 1 : 80 and 1 : 128, depending on the laboratory. In addition, only dogs whose owners filled out a standardised history questionnaire were included in the study. Information collected from the questionnaire included origin, travel

Veterinary Record (2012)

doi: 10.1136/vr.100637

K. Geisweid,
R. Mueller, DrMedVet, DrHabil,
DipECVD+ACVD (Dermatology).
K. Hartmann, DrMedVet, DrHabil,
DipECVIM-CA,
Clinic of Small Animal Medicine, LMU
University of Munich, Veterinärstr. 13,
Munich 80539, Germany
C. Sauter-Louis, DrMedVet,
Clinic for Ruminants with Ambulatory
Clinic and Herd Health Management,

LMU University of Munich, Sonnenstr.
16, Oberschleißheim 85764, Germany

E-mail for correspondence:
Vorstandsassistentz@medizinische-
kleintierklinik.de

Provenance: not commissioned;
externally peer reviewed

Accepted July 11, 2012

Papers

and medical history, and, if applicable, cause of death. Data obtained from the medical records comprised signalment, presenting clinical signs, results of physical examination, haematology, serum biochemistry profile, urinalysis and potential co-infection with *Ehrlichia canis* and *Babesia canis* (proven by presence of antibodies or direct detection), abdominal ultrasound and radiological findings, dermatologic examination and initiated treatment protocols. Antibody titres and PCR were carried out by commercial laboratories (antibody titres were assessed by two different laboratories. Laboratory 1: synlab Labordienstleistungen, Augsburg Germany; laboratory 2: Institute of Comparative Tropical Medicine and Parasitology, LMU University of Munich, Germany.) Proteinuria was diagnosed either by a positive urine dipstick, if urine sediment was clear, or by an elevated UP/C (>0.5). Renal azotaemia was defined as increased creatine ($>117 \mu\text{mol/l}$) with low urine specific gravity (<1025). Hypoalbuminemia was present when serum albumin concentration was below 25 g/dl . Lymphopenia was defined as a total lymphocyte count in peripheral blood below $1 \times 10^9/\text{l}$. Dogs were considered to be treated for leishmaniasis, when a drug that has proven to be effective against *L. infantum* was administered at any time during the study period. If more than one visit was documented, data of the first visit were used for evaluation.

Statistical analysis

A survival analysis using Kaplan-Meier product limit method was conducted to assess inter-group differences in survival times between dogs treated and those not treated, as well as between dogs with and without laboratory abnormalities and clinical signs. To assess the influence of antibody titre, dogs were grouped according to their antibody titre level in 'low antibody titre', 'medium antibody titre', and 'high antibody titre' (Table 1). Survival time was defined as time (in days) from first presentation to time of death. The date of last contact served as date of censoring for dogs that were lost to follow-up. The presence of a statistically significant influence of categorical variables such as sex, presenting clinical signs, antibody titre, laboratory abnormalities and treatment on survival times was assessed by the Log-Rank test. SPSS for Windows 16.0 was used for statistical analysis. Null hypotheses were rejected when P values were less than 0.05.

Results

Patient population

Seventy-two dogs were included in the study. Fifty-two of these dogs were diagnosed by detection of antibodies, six by PCR, and 14 by cytology. The majority of patients were mixed breed dogs (33 per cent); the others were from 36 different breeds. Forty-two dogs were male (58 per cent), 30 female (42 per cent). Median age was 8.1 years (range 0.8 years–16.8 years). Sixty-one dogs (83 per cent) were imported from endemic countries, mainly from Spain ($n=28$), Italy ($n=11$), and Greece ($n=9$). Twelve dogs (16 per cent) had travelled to a Mediterranean country with their owners, mainly to Italy ($n=6$). In two dogs, no history of being abroad was reported. In one patient, a second dog with a travel history in the household was infected with *L. infantum*. In the other patient, the way of infection remained unknown.

In addition to an infection with *L. infantum*, eight dogs were co-infected with *E. canis*, eight with *B. canis*, and two dogs were co-infected with both agents. Mean survival time for dogs with *Ehrlichia* co-infection was 4.1 years, and with *Babesia*, co-infection was 4.2 years, while survival time in dogs without *Babesia* and *Ehrlichia*, infection was 4.3 years.

All patients included in the study showed clinical signs and/or clinicopathologic abnormalities compatible with canine leishmaniasis. Twenty-seven of the patients were oligosymptomatic (1–2 clinical signs) and 30 were polysymptomatic (≥ 3 clinical signs), whereas five dogs showed no clinical signs on physical examination, but had laboratory abnormalities. Findings from history and physical examination, as well as laboratory abnormalities, are presented in Table 2.

Fifty-eight dogs (80 per cent) received treatment for canine leishmaniasis. The most commonly used drugs were allopurinol ($n=30$; 51 per cent) or a combination of n-methyl-glucamin-antimonate and allopurinol ($n=27$; 42 per cent). One dog was solely treated with n-methyl-glucamin-antimonate. Fourteen dogs (30 per cent) received no treatment for their *Leishmania* infection. Thirty-eight dogs (52 per cent) had died or been euthanased at the study's end point. The median survival time in these dogs was 2.2 years (range 0–8.4 years).

Prognostic factors

Several clinical signs and/or laboratory abnormalities diagnosed at time of first presentation were significantly associated with decreased survival time, including proteinuria ($p<0.001$), hypoalbuminemia ($p<0.001$), and renal azotaemia ($p<0.001$).

When taking into account only animals that were diagnosed by antibody titre, additionally, lymphopenia ($p=0.015$) significantly influenced survival, whereas in patients diagnosed by direct detection of the parasite, lymphopenia was not a prognostic parameter. Comparing only patients that received treatment for their *Leishmania* infection, proteinuria ($p=0.001$) (Fig 1), hypoalbuminemia ($p=0.002$) (Fig 2), renal azotaemia ($p<0.001$) (Fig 3), and lymphopenia ($p=0.040$) (Fig 4) influenced outcome (Table 3).

A statistically significant survival benefit of anti-*Leishmania* treatment was found ($p=0.003$). Benefit of treatment was also assessed with regard to antibody titre (Table 1). When comparing the two most commonly used treatment protocols in the study, allopurinol versus a combination of allopurinol and meglumine antimonate, no difference in survival time could be detected ($p=0.157$). The antibody titre ($p=0.982$) did not influence survival time, nor did any other clinical sign or laboratory abnormality. Co-infection with *E. canis* and *B. canis* also did not significantly influence prognosis ($p=0.918$).

Discussion

In this study, data from dogs naturally infected with *L. infantum* were reviewed.

Most of the dogs included in the study had been imported to Germany, or had travelled to endemic countries. Interestingly, two dogs had no travel history although the risk for autochthonous transmission in Germany is considered to be extremely low. Nevertheless, infection has been described occasionally in dogs that had no travel history but lived together with infected dogs (Diaz-Espineira and Slappendel 1997). This was the case in one of the two patients in which direct transmission had likely occurred. The other dog was kept as a family dog, living mainly indoors. Although the first sand fly species was found in southwest Germany (Naucke and Pesson 2000), the dog never lived or travelled to this area. Transfer of infected sand flies over shorter distances and under favourable conditions has been described (Bogdan and others 2001), but *L. infantum* infection as a result of introduction of sand flies by car or plane appears to be unlikely as the vector is quite intolerant to temperature changes. Nevertheless, this patient was not living near an airport or highway. Other possible ways of infection, such as a contaminated blood transfusion (de Freitas and others 2006) or congenital transmission

TABLE 1: Dogs ($n=52$) in which antibody titres were available grouped according to their antibody titres and number of dogs in each antibody titre group with regard to treatment and mean survival time of treated dogs per antibody titre group

Antibody titre group	Antibody titre level laboratory 1	Antibody titre level laboratory 2	n	Number of treated dogs	Mean survival time (of treated dogs) (days)	Number of non-treated dogs
(1) Low	1:80–1:160	1:128	15	11	1732 (SD 330)	4
(2) Medium	1:320–1:640	1:256–1:512	25	21	1653 (SD 186)	4
(3) High	$>1:640$	$>1:512$	12	11	1794 (SD 405)	1
Total			52	43		9

n, number of dogs

TABLE 2: Clinical signs reported in the history, physical and dermatologic examination findings, and laboratory abnormalities

Symptoms	Number of dogs	
History/questionnaire		
Weakness	49/72	
Skin problems	47/72	
Diarrhoea	31/72	
Abnormal locomotion	24/72	
Weight loss	24/72	
Polyuria/polydipsia	19/72	
Conjunctivitis	18/72	
Physical examination		
Lymphadenopathy	34/66	
Splenomegaly	12/66	
Impaired general condition	33/66	
Cachexia	16/66	
Abnormal locomotion (stiffness, lameness)	16/66	
Polyarthritis	1/16	
Ocular signs (conjunctivitis, uveitis)	10/66	
Fever (unresponsive to prior antibiotic treatment)	6/66	
Pale mucus membranes/prolonged capillary refilling time	9/66	
Nasal discharge	5/66	
Epistaxis	1/5	
Dermatologic examination		
Diffuse alopecia	24/36	
Scaling	22/36	
Pruritus	18/36	
Laboratory abnormalities		Reference ranges
Haematology		
Thrombocytopenia	21/66	150–500 × 10 ⁹ /l
Anaemia	20/66	35–58%
Nonregenerative anaemia	3/20	
Leukopenia	9/66	5–16 × 10 ⁹ /l
Lymphopenia	19/66	1–3.6 × 10 ⁹ /l
Neutropenia	6/66	3–9 × 10 ⁹ /l
Monocytopenia	5/66	0.04–0.5 × 10 ⁶ /l
Neutrophilia with left shift	6/66	3–9 × 10 ⁹ /l
Pancytopenia	4/66	
Chemistry profile		
Renal azotaemia	18/57	
Hypoalbuminemia	23/57	25–44 g/l
Hyperglobulinaemia	21/57	48–76 g/l
Elevated alanine amino transferase activity	7/57	0–91 U/l
Elevated alkaline phosphatase activity	9/57	0–225 U/l
urine analysis		
Proteinuria	25/49	
<i>Babesia canis</i> co-infection	10/72	
Thrombocytopenia	3/8	150–500 × 10 ⁹ /l
Anaemia	4/8	35–58%
Lymphopenia	1/8	1–3.6 × 10 ⁹ /l
Pancytopenia	1/8	
Renal azotaemia	4/9	
Proteinuria	5/7	
<i>Ehrlichia canis</i> co-infection	10/72	
Thrombocytopenia	8/8	150–500 × 10 ⁹ /l
Anaemia	7/8	35–58%
Lymphopenia	5/8	1–3.6 × 10 ⁹ /l
Pancytopenia	–	
Renal azotaemia	–	
Proteinuria	2/5	

(Rosypal and others 2005) could be ruled out, as well. Thus, this dog's route of infection remains unknown.

The median age of 8.1 years of dogs included in the study is surprisingly high. It is reported that there are two age groups presenting clinical overt disease (Abranches and others 1991b, Cardoso and others 2004). In the first group—mainly young dogs—severe clinical signs appear shortly after infection. By contrast, patients belonging to the second group remain infected for a long period of time without apparent lesions or clinical disease. However, a change in health status of these dogs can lead to activation of a latent infection (Pinelli and others 1994, Barbieri 2006). Most of the dogs included in the present study were imported from endemic countries. Dramatic environmental and climatic changes, which are part of the rehoming process, may have contributed to the development of clinical signs by causing

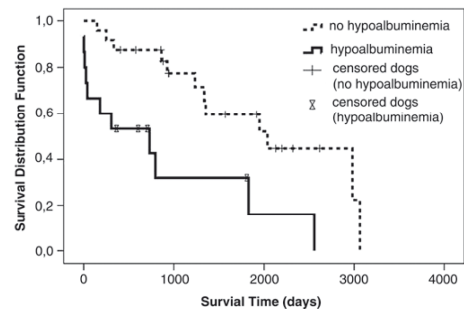


FIG 1: Overall survival in Kaplan-Meier survival curves differentiating two groups: dogs with and dogs without hypoalbuminemia (only treated dogs were taken into account). All deaths were considered events in this analysis. Hatch marks indicate censored dogs

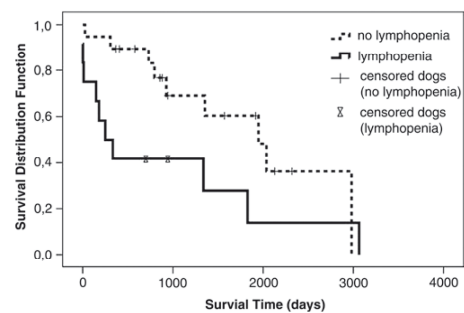


FIG 2: Overall survival in Kaplan-Meier survival curves differentiating two groups: dogs with and dogs without renal lymphopenia (only treated dogs were taken into account). All deaths were considered events in this analysis. Hatch marks indicate censored dog

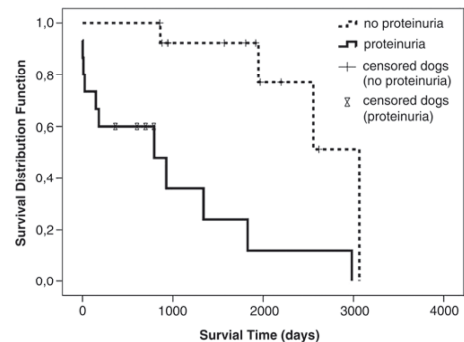


FIG 3: Overall survival in Kaplan-Meier survival curves differentiating two groups: dogs with and dogs without proteinuria (only treated dogs were taken into account). All deaths were considered events in this analysis. Hatch marks indicate censored dogs

Papers

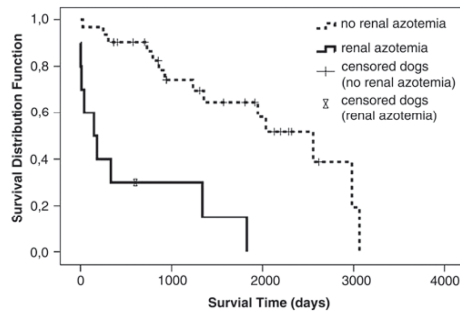


FIG 4: Overall survival in Kaplan-Meier survival curves differentiating two groups: dogs with and dogs without renal azotaemia (only treated dogs were taken into account). All deaths were considered events in this analysis. Hatch marks indicate censored dogs

TABLE 3: Factors significantly influencing overall survival time in treated dogs

	n	Median survival time (in days)	SD (in days)	95% CI (in days)	Level of significance (P)
Proteinuria					
Present	15	795	458	0-1693	<0.001
Absent	14	3064	0	-	
Hypoalbuminemia					
Present	15	731	445	0-1604	0.040
Absent	24	2037	571	916-3157	
Renal azotaemia					
Present	10	148	111	0-366	<0.001
Absent	31	2557	441	1115-2780	
Lymphopenia					
Present	12	251	132	0-510	0.002
Absent	19	1948	424	916-3157	

Kaplan-Meier product limit method was used to assess inter-group differences in survival time
All deaths were considered events in this analysis
n, number of dogs

immunosuppression. Additionally, it can be assumed that young, apparently diseased dogs are not adopted frequently. This may explain the high median age of the dogs in the present study. Therefore, in non-endemic countries, age distribution may be different than in endemic countries (Ciaramella and others 1997).

Other than expected, the level of antibody titre in this study was not correlated with survival time. Most of the former studies were carried out in endemic regions, where super-infection or reinfection could not be ruled out. A continuous infection pressure in endemic areas may stimulate the immune system through a higher parasite burden (Reis and others 2006), or broader genetic variation of the parasite, thus influencing pathogenicity. Therefore, overall survival time could be more influenced by antibody titre levels under these circumstances than in non-endemic regions. Better living conditions and less exposure to other infectious agents may also play a role, as is the case in human medicine, where leishmaniasis is mainly a problem in less developed countries. Since bias of reinfection could be excluded, this is the first study that appropriately describes the correlation between outcome and anti-*Leishmania* antibody titre in a non-endemic region.

Proteinuria appears to be a very good prognostic parameter. Dogs diagnosed with proteinuria survived a median of 795 days, whereas dogs without proteinuria lived a median of 3064 days. There is only little information about the incidence of proteinuria in naturally infected dogs, although histopathologic evidence of chronic renal disease has been demonstrated to be common (Costa and others 2003, Zatelli and others 2003). Today it is well known that persistent proteinuria is not only a marker for glomerular changes, but is also associated with greater renal morbidity and mortality (Lees and others 2005). Therefore, pro-

teinuria has been part of a staging system to assess prognosis in canine leishmaniasis (Solano-Gallego and others 2009). The present study emphasises the importance of proteinuria and indicates that it is mandatory to control proteinuria as soon as possible in the course of infection to stop progression of renal damage, which is accompanied by renal azotemia. As indicated by the results of the present study, renal azotemia was also associated with shortened survival time. Hypoalbuminemia was a good prognostic parameter in this study. As proteinuria was a common finding in the current survey, the decreased albumin concentration is likely the consequence of persistent renal loss caused by ongoing glomerular damage, which is obviously associated with a poorer prognosis. Additionally, albumin could be considered a negative acute phase protein (APP), which is down-regulated in acute phase response occurring after tissue damage of infectious, immune-mediated, and neoplastic origin. In canine leishmaniasis, it has been proven that APPs can be used as markers for disease, although the prognostic value of albumin has not been evaluated (Martinez-Subiela and others 2011). Therefore, hypoalbuminemia could be indicative of clinical deterioration. In a critical care setting, hypoalbuminemia is associated with poor prognosis in many disease processes in human as well as veterinary medicine (Weinkle and others 2005, Lai and others 2011). Albumin has important effects on binding and transporting drugs and hormones, and maintains colloid osmotic pressure. Therefore, it has become an important part of a scoring system to evaluate severely diseased patients (Whittemore and others 2011). All the above mentioned factors may have contributed to the reduced survival time noticed in the current study.

Lymphopenia (less than $1.0 \times 10^9/l$) (reported in 28 per cent of the cases) was also significantly correlated with median survival, when only treated patients were taken into account. Median survival time in patients with lymphopenia was 251 days, whereas dogs with lymphocyte numbers in the reference range lived a median of 1948 days. Protective immunity against *Leishmania* parasites is mediated by CD4 T helper cell responses (Strauss-Ayali and others 2007). During infection, dogs become incrementally immunosuppressed, which is associated with a decrease in CD4 lymphocyte count, as well as in CD4/CD8 ratio (Bourdoiseau and others 1997). In humans, the depletion of CD4 T cells is associated with an increased susceptibility to opportunistic pathogens (Abbas and others 2007). The lymphopenia in dogs possibly mirrors this phenomenon of increasing immunosuppression. However, in this study, most of the lymphopenic dogs died of reasons related to progressive disease, without evidence of opportunistic infections. It also has to be considered that stress associated with clinical deterioration can lead to a 'stress leukogram' that also may result in a decreased lymphocyte count. Neither any other evaluated parameter in clinical or laboratory examination, nor infection with *E. canis* or *B. canis* was correlated with survival time.

Anti-leishmanial therapy in dogs is considered to only achieve a temporary clinical cure and seldom, if at all, a total elimination of the parasite (Noli and Auxilia 2005); therefore, one aim of this study was to find out if treatment in a country where reinfection is extremely unlikely influences survival time. More than 50 per cent of the dogs in this study were treated for leishmaniasis. When evaluating data of all dogs, therapy resulted in a significant survival benefit of 1900 days. This observation highlights the importance of controlling parasite burden by treatment to increase survival time. However, the significant difference is caused by a large number of deaths or euthanasia within the first 14 days of the initial presentation. As there are no pathognomonic signs in canine leishmaniasis, long-standing signs may have been misinterpreted by owners or referring veterinarians, and therefore, animals sometimes were presented very late in the course of disease. The severely compromised general health status may have influenced the clinician's decision not to recommend treatment of the *Leishmania* infection, but to euthanase the dog. Alternatively, owners may have been reluctant to begin costly and intensive therapy in a dog with a highly reduced quality of life and a guarded prognosis. When excluding dogs that died or were euthanased within the first two weeks after initial presentation, only three patients remained untreated; thus, comparisons in a survival analysis was not possible. In this study, no difference in survival time could be detected between dogs that were only treated with allopurinol, and dogs that received a combination of allopurinol and n-methyl-glucamin antimonate. This is quite unexpected, as

allopurinol is reported to have a poor efficacy when administered as monotherapy (Oliva and others 2010). Furthermore, a combination of antimonial compounds and allopurinol seems to be more effective than either drug alone (Denerolle and Bourdoiseau 1999). However, this result has to be interpreted with caution, as a broad variation in drug dosages and duration of treatment makes a comparison between the above mentioned regimes rather difficult. Comparison of treatment regimens should best be evaluated in prospective blinded studies.

Limitations of this study are the potential sources of bias. In this survey, a very heterogeneous group of dogs was included, such as patients recently diagnosed, as well as those with a long history of disease. Records were reviewed retrospectively and, therefore, a complete clinical workup was not available for every patient. In addition, the way of diagnosing *Leishmania* infection and, therefore, the inclusion criteria were not the same for all dogs. This difference may have biased the comparison.

In conclusion, the level of antibody titres did not influence survival time, therefore, antibody titres were not found useful as a prognostic indicator in the current study. More useful parameters to predict shorter survival and worse prognosis are proteinuria, hypoalbuminemia, renal azotaemia, as well as lymphopenia. As treatment against *L. infantum* resulted in a prolonged survival time, infected dogs should be treated.

Acknowledgements

Results of this study were partially presented at the German Internal Medicine and Clinical Pathology Conference 2009 in Berlin, Germany, and the ACVIM Forum & Canadian Veterinary Medical Association Convention 2009 in Montréal, Canada.

References

- ABBAS, A., A. L. & S., P. Eds. (2007) Cellular and Molecular Immunology, Section V – immunity in defense and disease, Chapter 20 – congenital and acquired immunodeficiencies, Saunders.
- ABRANCHES, P., SANTOS-GOMES, G., RACHAMIM, N., CAMPINO, L., SCHNUR, L. F. & JAFFE, C. L. (1991a) An experimental model for canine visceral leishmaniasis. *Parasite Immunology* **13**, 537–550.
- ABRANCHES, P., SILVA-PEREIRA, M. C., CONCEICAO-SILVA, F. M., SANTOS-GOMES, G. M. & JANZ, J. G. (1991b) Canine leishmaniasis: pathological and ecological factors influencing transmission of infection. *The Journal of Parasitology* **77**, 557–561.
- ALVAR, J., CANAVATE, C., MOLINA, R., MORENO, J. & NIETO, J. (2004) Canine leishmaniasis. *Advances in Parasitology* **57**, 1–88.
- BANETH, G., KOUTINAS, A. F., SOLANO-GALLEGO, L., BOURDEAU, P. & FERRER, L. (2008) Canine leishmaniosis – new concepts and insights on an expanding zoonosis: part one. *Trends in Parasitology* **24**, 324–330.
- BARBIERI, C. L. (2006) Immunology of canine leishmaniasis. *Parasite Immunology* **28**, 329–337.
- BOGDAN, C., SCHONIAN, G., BANULS, A. L., HIDE, M., PRATLONG, F., LORENZ, E., ROLLINGHOFF, M. & MERTENS, R. (2001) Visceral leishmaniasis in a German child who had never entered a known endemic area: case report and review of the literature. *Clinical Infectious Diseases* **32**, 302–306.
- BOURDOISEAU, G., BONNEFONT, C., MAGNOL, J. P., SAINT-ANDRE, I. & CHABANNE, L. (1997) Lymphocyte subset abnormalities in canine leishmaniasis. *Veterinary Immunology and Immunopathology* **56**, 345–351.
- CARDOSO, L., NETO, F., SOUSA, J. C., RODRIGUES, M. & CABRAL, M. (1998) Use of a leishmanin skin test in the detection of canine Leishmania-specific cellular immunity. *Veterinary Parasitology* **79**, 213–220.
- CARDOSO, L., RODRIGUES, M., SANTOS, H., SCHOONE, G. J., CARRETA, P., VAREIAO, E., VAN BENTHEM, B., AFONSO, M. O., ALVES-PIRES, C., SEMIAO-SANTOS, S. J., RODRIGUES, J. & SCHALLIG, H. D. (2004) Sero-epidemiological study of canine Leishmania spp. infection in the municipality of Alijo (Alto Douro, Portugal). *Veterinary Parasitology* **121**, 21–32.
- CIARAMELLA, P., OLIVA, G., LUNA, R. D., GRADONI, L., AMBROSIO, R., CORTESE, L., SCALONE, A. & PERSECHINO, A. (1997) A retrospective clinical study of canine leishmaniasis in 150 dogs naturally infected by Leishmania infantum. *The Veterinary Record* **141**, 539–543.
- COSTA, F. A., GOTO, H., SILDANHA, L. C., SILVA, S. M., SINHORINI, I. L., SILVA, T. C. & GUERRA, I. L. (2003) Histopathologic patterns of nephropathy in naturally acquired canine visceral leishmaniasis. *Veterinary Pathology* **40**, 677–684.
- DE FREITAS, E., MELO, M. N., DA COSTA-VAL, A. P. & MICHALICK, M. S. (2006) Transmission of Leishmania infantum via blood transfusion in dogs: potential for infection and importance of clinical factors. *Veterinary Parasitology* **137**, 159–167.
- DENEROLLE, P. & BOURDOISEAU, G. (1999) Combination allopurinol and antimony treatment versus antimony alone and allopurinol alone in the treatment of canine leishmaniasis (96 cases). *Journal of Veterinary Internal Medicine* **13**, 413–415.
- DIAZ-ESPINEIRA, M. M. & SLAPPENDEL, R. J. (1997) A case of autochthonous canine leishmaniasis in The Netherlands. *The Veterinary Quarterly* **19**, 69–71.
- KOUTINAS, A. F., POLIZOPOULOU, Z. S., SARIDOMICHELAKIS, M. N., ARGYRIADIS, D., FYTIANOU, A. & PLEVRAKI, K. G. (1999) Clinical considerations on canine visceral leishmaniasis in Greece: a retrospective study of 158 cases (1989–1996). *Journal of the American Animal Hospital Association* **35**, 376–383.
- LAI, C. C., YOU, J. F., YEH, C. Y., CHEN, J. S., TANG, R., WANG, J. Y. & CHIN, C. C. (2011) Low preoperative serum albumin in colon cancer: a risk factor for poor outcome. *International Journal of Colorectal Disease* **26**, 473–481.
- LEES, G. E., BROWN, S. A., ELLIOTT, J., GRAUER, G. E. & VADEN, S. L. (2005) Assessment and management of proteinuria in dogs and cats: 2004 ACVIM Forum Consensus Statement (small animal). *The Journal of Veterinary Internal Medicine* **19**, 377–385.
- MARTINEZ-SUBIELA, S., STRAUSS-AYALI, D., CERON, J. J. & BANETH, G. (2011) Acute phase protein response in experimental canine leishmaniasis. *Veterinary Parasitology* **180**, 197–202.
- METTLER, M., GRIMM, F., NAUCKE, T. J., MAASJOST, C. & DEPLAZES, P. (2005) Canine leishmaniosis in Central Europe: retrospective survey and serological study of imported and travelling dogs. *Berliner und Münchener Tierärztliche Wochenschrift* **118**, 37–44.
- NAUCKE, T. J. & PESSON, B. (2000) Presence of Phlebotomus (Transphlebotomus) mascittii Grassi, 1908 (Diptera: Psychodidae) in Germany. *Parasitology Research* **86**, 335–336.
- NOLL, C. & AUXILIA, S. T. (2005) Treatment of canine Old World visceral leishmaniasis: a systematic review. *Veterinary Dermatology* **16**, 213–232.
- OLIVA, G., DVM, X. R., CROTTI, A., MAROLI, M., CASTAGNARO, M., GRADONI, L., LUBAS, G., PALTRINIERI, S., ZATELLI, A. & ZINI, E. (2010) Guidelines for treatment of leishmaniasis in dogs. *Journal of the American Veterinary Medical Association* **236**, 1192–1198.
- PALTRINIERI, S., SOLANO-GALLEGO, L., FONDATI, A., LUBAS, G., GRADONI, L., CASTAGNARO, M., CROTTI, A., MAROLI, M., OLIVA, G., ROURA, X., ZATELLI, A. & ZINI, E. (2010) Guidelines for diagnosis and clinical classification of leishmaniasis in dogs. *Journal of the American Veterinary Medical Association* **236**, 1184–1191.
- PINELLI, E., KILLICK-KENDRICK, R., WAGENAAR, J., BERNADINA, W., DEL REAL, G. & RUITENBERG, J. (1994) Cellular and humoral immune responses in dogs experimentally and naturally infected with Leishmania infantum. *Infection and Immunity* **62**, 229–235.
- REIS, A. B., TEIXEIRA-CARVALHO, A., VALE, A. M., MARQUES, M. J., GIUNCHETTI, R. C., MAYRINK, W., GUERRA, L. L., ANDRADE, R. A., CORREA-OLIVEIRA, R. & MARTINS-FILHO, O. A. (2006) Isotype patterns of immunoglobulins: hallmarks for clinical status and tissue parasite density in Brazilian dogs naturally infected by Leishmania (Leishmania) chagasi. *Veterinary Immunology and Immunopathology* **112**, 102–116.
- ROSYAL, A. C., TROY, G. C., ZAIAC, A. M., FRANK, G. & LINDSAY, D. S. (2005) Transplacental transmission of a North American isolate of Leishmania infantum in an experimentally infected beagle. *The Journal of Parasitology* **91**, 970–972.
- SHAW, S. E., LERGA, A. I., WILLIAMS, S., BEUGNET, E., BIRTLES, R. J., DAY, M. J. & KENNY, M. J. (2003) Review of exotic infectious diseases in small animals entering the United Kingdom from abroad diagnosed by PCR. *The Veterinary Record* **152**, 176–177.
- SOLANO-GALLEGO, L., KOUTINAS, A., MIRO, G., CARDOSO, L., PENNISI, M. G., FERRER, L., BOURDEAU, P., OLIVA, G. & BANETH, G. (2009) Directions for the diagnosis, clinical staging, treatment and prevention of canine leishmaniosis. *Veterinary Parasitology* **165**, 1–18.
- STRAUSS-AYALI, D., BANETH, G. & JAFFE, C. L. (2007) Splenic immune responses during canine visceral leishmaniasis. *Veterinary Research* **38**, 547–564.
- TESKE, E., VAN KNAPEN, E., BEIJER, E. G. & SLAPPENDEL, R. J. (2002) Risk of infection with Leishmania spp. in the canine population in the Netherlands. *Acta Veterinaria Scandinavica* **43**, 195–201.
- WEINKLE, T. K., CENTER, S. A., RANDOLPH, J. E., WARNER, K. L., BARR, S. C. & ERB, H. N. (2005) Evaluation of prognostic factors, survival rates, and treatment protocols for immune-mediated hemolytic anemia in dogs: 151 cases (1993–2002). *Journal of the American Veterinary Medical Association* **226**, 1869–1880.
- WHITTEMORE, I. C., MARCUM, B. A., MAWBY, D. I., COLEMAN, M. V., HACKET, T. B. & LAPPIN, M. R. (2011) Associations among albuminuria, C-reactive protein concentrations, survival predictor index scores, and survival in 78 critically ill dogs. *Journal of Veterinary Internal Medicine* **25**, 818–824.
- ZATELLI, A., BORGARELLI, M., SANTILLI, R., BONFANTI, U., NIGRISOLI, E., ZANATTA, R., TARDUCCI, A. & GUARRACI, A. (2003) Glomerular lesions in dogs infected with Leishmania organisms. *American Journal of Veterinary Research* **64**, 558–561.

Downloaded from veterinaryrecord.bmj.com on August 23, 2012 - Published by group.bmj.com



Prognostic analytes in dogs with *Leishmania infantum* infection living in a non-endemic area

K. Geisweid, R. Mueller, C. Sauter-Louis, et al.

Veterinary Record published online August 22, 2012

doi: 10.1136/vr.100637

Updated information and services can be found at:

<http://veterinaryrecord.bmj.com/content/early/2012/08/21/vr.100637.full.html>

These include:

- | | |
|-------------------------------|--|
| References | This article cites 33 articles, 6 of which can be accessed free at:
http://veterinaryrecord.bmj.com/content/early/2012/08/21/vr.100637.full.html#ref-list-1 |
| P<P | Published online August 22, 2012 in advance of the print journal. |
| Email alerting service | Receive free email alerts when new articles cite this article. Sign up in the box at the top right corner of the online article. |
-

Notes

Advance online articles have been peer reviewed, accepted for publication, edited and typeset, but have not yet appeared in the paper journal. Advance online articles are citable and establish publication priority; they are indexed by PubMed from initial publication. Citations to Advance online articles must include the digital object identifier (DOIs) and date of initial publication.

To request permissions go to:
<http://group.bmj.com/group/rights-licensing/permissions>

To order reprints go to:
<http://journals.bmj.com/cgi/reprintform>

To subscribe to BMJ go to:
<http://group.bmj.com/subscribe/>

IV. MANUSKRIFT

Evaluation of conjunctival swab polymerase chain reaction for detection of *Leishmania infantum* in dogs in a non-endemic area

K. Geisweid¹

K. Weber, DrMedVet¹

C. Sauter-Louis, DrMedVet, PhD, DipECVPH²

K. Hartmann, DrMedVet, DrHabil, DipECVIM-CA¹

1) Clinic of Small Animal Medicine, LMU University of Munich, Germany

2) Clinic for Ruminants with Ambulatory Clinic and Herd Health Management,
LMU University of Munich, Germany

The Veterinary Journal, eingereicht zur Veröffentlichung

(Einverständniserklärung zur Aufnahme in die Dissertation von allen Co-Autoren
vorhanden)

Abstract

Due to increasing numbers of dogs that are imported from or visited Mediterranean countries, canine leishmaniasis has become an important infectious disease in Germany. Although conjunctival swabs have recently been described as useful diagnostic tool in endemic areas, their usefulness in non-endemic areas is unknown. Thus, the aim of this study was to evaluate sensitivity and specificity of conjunctival swab polymerase chain reaction (PCR) in dogs in a non-endemic area. Seventy four dogs that were presented for suspected canine leishmaniasis or for screening purposes after a history of travelling were prospectively included. PCR results from conjunctival swabs were compared to those from bone marrow, lymph node, blood and to antibody results determined by IFA or ELISA. Dogs were considered infected if bone marrow, lymph node, or blood PCR was positive and were defined as not infected if bone marrow PCR, the gold standard of testing, was negative. Sensitivity and specificity of conjunctival swab PCR were 78.4% (CI 95% 62.8-88.6) and 83.3% (CI 95% 68.1-92.1). There was substantial agreement between PCR results from conjunctival swabs and lymph nodes ($\kappa = 0.642$), fair to moderate agreement between conjunctival swab and bone marrow ($\kappa = 0.483$) and almost no agreement between conjunctival swab and blood ($\kappa = 0.070$). Dogs with high antibody titres were more likely to be positive on conjunctival swab PCR than dogs with negative or doubtful antibody titres ($p < 0.001$). Thus, conjunctival swab PCR is a good non-invasive test to diagnose *Leishmania* infection in dogs in non-endemic countries.

Introduction

Leishmaniasis is a systemic disease with zoonotic potential caused by the intracellular protozoan parasite *Leishmania* (L.) *infantum* or *chagasi*. The infection occurs endemically in regions of the Mediterranean basin, Africa, Asia, and South America. Some infected dogs can develop overt clinical disease, whereas others remain asymptomatic carriers without detectable clinical signs (Baneth et al., 2008; Solano-Gallego et al., 2009). In Northern Europe, including Germany, where no natural transmission occurs as the environmental conditions prevent viability of the vector (Shaw et al., 2003; Teske et al., 2002), leishmaniasis has become an important infectious disease in dogs with a history of travelling (Mettler et al., 2005).

To definitively diagnose the disease in sick dogs, to prevent disease transmission from subclinical carriers, and to avoid introduction of infected dogs to non-endemic countries, reliable diagnostic tests for detection of *Leishmania* infection are essential. Various diagnostic techniques have been described. Antibody detection methods, such as the immunofluorescence assay (IFA) or enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), are commonly used. These tests lack sensitivity in early or subclinical cases and also can be false negative in dogs with clinical disease (Gomes et al., 2008). In addition, antibody detection can show false positive results due to cross reactivity with other infectious agents or other *Leishmania* species (Ferreira Ede et al., 2007). Polymerase chain reaction (PCR) is very specific and has greatly improved the sensitivity in diagnosing *Leishmania* infection (Maia and Campino, 2008). Parasitic DNA can be detected in a broad range of clinical specimens, including blood, skin biopsies, lymph node, and bone marrow. PCR of blood is commonly performed but lacks sensitivity. PCR of bone marrow samples is currently considered the gold standard for diagnosis as it has the highest sensitivity among all specimen (Maia and Campino, 2008). However, bone marrow samples are obtained invasively usually under general anesthesia and owners are reluctant to allow the performance of such invasive diagnostic testing. Therefore, a growing interest in non-invasively obtained samples, e.g., conjunctival swabs, evolved. In the first studies published, this method showed a high sensitivity for diagnosis of *Leishmania* infection both in clinically diseased (Ferreira Sde et al., 2008; Strauss-Ayali et al., 2004) as well as in asymptomatic

dogs (Leite et al., 2010; Lombardo et al., 2012), but no studies on diagnostic utility of conjunctival swab PCR in non-endemic areas have been performed. As re- and superinfection is unlikely in non-endemic areas, parasite loads might be much lower than in endemic areas, which could reduce sensitivity of molecular methods. The aim of the present study was to evaluate sensitivity and specificity of conjunctival swab PCR in symptomatic as well as asymptomatic dogs in a non-endemic area.

Materials and Methods

Dogs

Seventy four dogs that were presented to the Clinic of Small Animal Internal Medicine of the LMU University of Munich, Germany, between the years 2007 and 2011 for suspected canine leishmaniasis (with clinical signs, $n = 37$) or for screening for *Leishmania* infection (asymptomatic dogs, $n = 37$) because of a history of travelling to or previously having lived in endemic areas were prospectively included in the study. In all dogs included in the study, a physical examination was performed. Patients were categorized according to the number of clinical signs in asymptomatic (no clinical signs), oligosymptomatic (1-2 clinical signs), and polysymptomatic (≥ 3 clinical signs) (table 1).

Dogs included were from 22 different breeds. The majority of patients were mixed breed dogs ($n = 47$). There were 46 female and 29 male dogs. Age ranged from 0.2 years – 16.1 years (median age 5.9 years) in 54 dogs, in which age was known. The remaining dogs were adults. Thirty seven dogs had been to Italy, 22 to Spain, three to Greece, two to Malta and Thailand, and one each to France, Croatia, Turkey, Russia, Burma, and the United States.

Dogs were defined as infected if bone marrow, lymph node aspirates, or blood PCR was positive. Dogs were defined as not infected if they were negative in bone marrow PCR irrespective of results of other locations, as this method with the highest sensitivity was considered the gold standard of testing. Owners consent was obtained before diagnostic procedures were performed.

Sample collection

Conjunctival cells of both eyes were separately sampled using sterile cotton swabs. Exfoliative epithelial cells were collected by rubbing the swab against the inner surface of the lower eyelid.

Fine needle aspirates were taken from both Lnn. poplitei. Aspirates were transferred to a sterile cotton swab. Conjunctival swabs as well as lymph node aspirates were frozen at -20°C in sterile tubes (1.5 ml Eppendorf Safe Lock tube, Eppendorf AF, Hamburg, Germany) until analyzed.

Bone marrow aspirates were collected with a thin biopsy needle (Monoject, Illinois sternal illias aspiration needle, Kendal, Mansfield, UK) in a sterile manner from the humerus under general anesthesia. Five hundred μ l of aspirate were transferred to an EDTA-coated tube (tube 2 ml, Sarsted, Nümbrecht, Germany) and stored at 4°C until DNA extraction.

Whole blood (5 ml) was obtained by venipuncture of the Vena saphena. An aliquot of 1 ml was transferred to an EDTA-coated tube (tube 2 ml, Sarsted, Nümbrecht, Germany) and stored at 4°C until DNA extraction. The remaining 4 ml were submitted for determination of anti-*Leishmania* antibody titres by IFA (Institute of Comparative Tropical Medicine and Parasitology, LMU University of Munich, Germany) or ELISA (IDEXX vet med lab, IDEXX GmbH, Ludwigsburg, Germany).

DNA extraction

DNA from conjunctival swabs, lymph node aspirates, and whole blood were extracted using DNeasy Blood & Tissue kit (Qiagen GmbH, Hilden, Germany) following the manufacturer's instructions. Briefly, samples were incubated with proteinase K for initial lysis. Lysate was transferred to QIAamp Mini spin column for DNA absorption to QIAamp membrane. Afterwards, bound DNA was washed in two centrifugation steps. Finally, purified DNA was eluted in elution buffer (10 mM Tris-Cl, 0.5 mM EDTA, pH 9).

From bone marrow aspirates, 500 μ l were incubated on ice for 20 minutes using 2.5 ml of lysis buffer (SDS solution 10%, 1M Tris pH 7.5, 0.5M EDTA, 5M NaCl, Aqua dest). After centrifugation (4,200 rpm, 10 minutes), cell pellets were incubated with 150 μ l of lysis buffer and 5 μ l of proteinase K (56°C, 12 hours). Extraction was performed by adding 125 μ l of phenol-chloroform-isoamylalcohol to 150 μ l of lysate. Organic and aqueous phase were separated by centrifugation at 13,000 rpm for 2 min. For DNA precipitation, 50 μ l of isopropanol and 50 μ l of 4 M ammonium acetate (pH 7.5) were added to the supernatant. After centrifugation at 13,000 rpm for 5 minutes, the precipitate was washed using 70% ethanol. The DNA pellet was resuspended in 50 μ l of TE buffer (10 mM Tris-Cl pH 7.5, 1 mM EDTA pH 8.0).

Polymerase Chain Reaction

PCR protocol was adapted from a protocol of Francino et al. (Francino et al., 2006) with minor modifications. *L. infantum*-specific oligonucleotide primers N13A (5'-AACTTTTCTGGTCCTCCGGG-3') and N13B (5'-CCCCAGTTTCCCGCCC-3') were used to amplify a 120-base-pair fragment of *Leishmania* kinetoplast DNA minicircle. PCR was carried out using the 7500 Real Time PCR System (Applied Biosystems, Applied Biosystems GmbH, Darmstadt, Germany) in a final volume of 30 µl. PCR reaction mixture contained 15 µl of Qiagen Quantitect SYBR Green PCR Master Mix (Qiagen GmbH, Hilden, Germany), compounded of dNTP mix, PCR buffer (Tris-Cl, KCl, (NH₄)₂SO₄, 5 mM MgCl₂, pH 8.7), HotStarTaq DNA Polymerase, and fluorescent dyes (SYBR Green I and ROX), 12.4 µl distilled water, 0.3 µl of each primer, and 2 µl template. The amplifying protocol included initial denaturation at 95°C for 10 minutes, followed by 40 cycles of denaturation at 95°C for 15 seconds, and annealing/extension at 60°C for 1 minute. DNA extracted from a dog with confirmed infection (positive bone marrow cytology) was used as a positive control. To ensure that negative results corresponded to true negative samples rather than to a problem with DNA loading, sample degradation, or PCR inhibition, sample DNA was also amplified for canine Na⁺/Ca²⁺ exchanger (NCX 1) gene by using a forward primer (5'-CCTAGGTCTCCTGCAGTGAAGT-3') and a reverse primer (5'-CCAAGACCCTTCCTTTGGA-3'). In addition, mixtures without DNA were included in all tests. Amplified fragments were analyzed by melting curve analysis. Specificity of PCR products was controlled by electrophoresis in a 1.5% agarose gel containing Gel Red Nucleic Acid Stain (Biotium, Hayward, CA) and visualization using UV light.

Statistical Analysis

Differences in clinical status and antibody titre group were analyzed using Chi-square test. P values less than 0.05 were considered significant. Sensitivity and specificity, as well as positive predictive value (PPV) and negative predictive value (NPV) of conjunctival swab PCR were calculated using 2x2 tables. Agreement between diagnostic techniques was determined using Cohen's kappa coefficient (κ). A κ value of 0.2 to 0.6 represents fair to moderate agreement,

a κ value of 0.6 to 0.8 represents substantial agreement, and a κ value of > 0.8 represents almost perfect agreement (Landis and Koch, 1977). SPSS for Windows 16.0 was used for all statistical analyses.

Results

Patients

Seventy four dogs were enrolled in the study. Of these, 43 were diagnosed with *Leishmania* infection (bone marrow aspirates 17/49 PCR-positive, blood 12/26 PCR-positive and lymph node aspirates 17/18 PCR-positive). Thirty dogs were defined as non-infected as bone marrow PCR was negative. Thus, prevalence of infection was 58.1 % of the 74 included dogs.

On physical examination 37 dogs had clinical signs compatible with canine Leishmaniasis, while 37 were considered asymptomatic (table 1). Of the 43 infected dogs, 26 showed clinical signs of leishmaniasis.

Sensitivity and Specificity of conjunctival swab PCR

Conjunctival swabs were analyzed in all 74 dogs included in the study. Thirty five of the 74 dogs were tested positive in conjunctival swab PCR. Sensitivity and specificity of conjunctival swab PCR were 78.4% (CI 95% 62.8-88.6) and 83.3% (CI 95% 68.1-92.1), respectively. PPV was 82.9% (CI 95% 67.3-91.9) and NPV was 79.0% (CI 95% 63.7-88.9). PCR results of bone marrow, lymph node, and blood in comparison to conjunctival swab PCR are listed in table 2. More severe clinical status, assessed by number of clinical signs, was not associated with positive conjunctival swab PCR results ($p = 0.930$) (table 1).

Antibody titres

Antibody titres were determined in 51 dogs (28 by IFA, 23 by ELISA). Ten dogs tested negative for antibodies, but four of these ten were found to be infected by PCR (table 3). Three of the four dogs had clinical signs, and one was asymptomatic. Another seven dogs had doubtful antibody titres; of these, two dogs were infected. Both infected dogs were asymptomatic. Dogs with high antibody titres were more likely to be positive on conjunctival swab PCR than dogs with negative or doubtful antibody-titres ($p < 0.001$).

Agreement between test results

There was substantial agreement between results of conjunctival swab and lymph node PCR ($\kappa = 0.642$), whereas there was only fair agreement between result of conjunctival swab PCR and bone marrow PCR ($\kappa = 0.483$). There was almost no agreement between results of conjunctival swab PCR and blood PCR ($\kappa = 0.070$). There was moderate agreement between conjunctival swab PCR and antibody testing ($\kappa = 0.523$).

Discussion

The purpose of this study was to evaluate the utility of conjunctival swab PCR to diagnose *Leishmania* infection in symptomatic as well as asymptomatic dogs in a non-endemic area and to compare the obtained values to those in endemic areas. In non-endemic areas parasite burden is expected to be lower, due to the fact that re-infection can be excluded. As only a limited number of macrophages are obtained using conjunctival swabs, the sensitivity of this diagnostic method is likely lower in specimen with low parasite load. However, sensitivity of 78.4% of conjunctival swab PCR was similar to those described in studies from endemic areas. Depending on the PCR protocol used for amplification of *Leishmania* DNA and depending on the patient population, sensitivity ranged from 43% to 95.6% in studies in endemic regions (Ferreira Sde et al., 2008; Leite et al., 2010; Lombardo et al., 2012; Pilatti et al., 2009; Strauss-Ayali et al., 2004). Thus, it can be assumed that conjunctival swab PCR is a useful tool also in non-endemic areas, in which low parasite load is expected.

After infection, *Leishmania* disseminates via infected macrophages to lymphoid organs. As the conjunctiva contains numerous lymphoid follicles to protect the eye from different noxe, it could be considered an active peripheral lymphoid organ and therefore, the parasite can spread to this tissue. *Leishmania* is also reported to have a distinct tissue tropism to dermal structures (Papadogiannakis et al., 2005). Due to the fact, that the conjunctiva is closely related to the skin, the presence of the parasite can also be explained by this affinity.

PCR using bone marrow is considered to have the highest sensitivity for diagnosing *Leishmania* infection (Maia et al., 2009) and is therefore considered the gold standard of testing. In this study, six dogs that were positive on bone marrow PCR were negative on conjunctival swab PCR. This result can be explained by variation in parasite load between both tissues representing different stages of parasite dissemination. Another possible explanation is that parasite-infected macrophages could be missed in conjunctival swabs, in which only exfoliative cells are sampled. However, in a recent study, conjunctival swab PCR was reported to be as sensitive as bone marrow PCR (De Almeida Ferreira et al., 2012). This could not be confirmed in the present study. There were two asymptomatic dogs, however, that tested positive in conjunctival swabs but not in

bone marrow. It is very likely that these two dogs were truly infected, although being asymptomatic. Conjunctival swabs were reported to become positive soon after *Leishmania* infection (Strauss-Ayali et al., 2004). Therefore, positive conjunctival swab PCR in these dogs could represent an early infection that has not yet disseminated to the bone marrow.

Lymph node aspirates are also considered to be highly sensitive for detection of *Leishmania* DNA in infected dogs (Maia et al., 2009; Manna et al., 2004). Conjunctival swab and lymph node PCR showed best agreement in the current study. This result is comparable with other reports, in which results from lymph node and conjunctival swabs were obtained (Lombardo et al., 2012). Parasite detection in lymph node and conjunctiva likely represents the same state of *Leishmania* dissemination.

However, there was marked discrepancy between conjunctival swab and blood PCR in this study. Of 25 dogs testing positive in conjunctival swabs, only 13 also tested positive in blood. The usefulness of blood PCR for the diagnosis of canine leishmaniasis is controversial. On one hand, studies considered blood samples a good diagnostic specimen for PCR-based diagnosis (Fisa et al., 2001; Manna et al., 2004); on the other hand, problems have occurred regarding DNA preparation and PCR inhibition negatively influencing sensitivity (De Almeida Ferreira et al., 2012; Lachaud et al., 2002).

As there are increasing numbers of reports of autochthonous infections (Naucke and Lorentz, 2012; Tanczos et al., 2012) in dogs without a history of traveling, testing becomes more important in non-endemic areas. There is only little information about prevalence of leishmaniasis in these regions. However, it can be assumed that prevalence in non-endemic is much lower than in endemic areas; negative predictive value, therefore, is much higher under these circumstances. This indicates that conjunctival swabs must be considered as a good non-invasive alternative for exclusion of leishmaniasis in dogs in non-endemic areas.

Thirty five dogs in the present study had anti-*Leishmania* antibodies. A fair agreement between presence of antibodies and a positive result in conjunctival swab PCR was found in this survey. However, dogs with high antibody titres were more likely to be positive in conjunctival swab PCR than dogs with low antibody titres. This can be due to a higher parasite burden in conjunctival swabs, which

increases in dogs with higher antibody titres (Lombardo et al., 2012). Of 17 dogs reported to be negative or doubtful by antibody testing, four had a positive conjunctival swab PCR result. A possible explanation for this discrepancy could be a difference in duration of infection. Antibody development in infected animals can take month to years (Oliva et al., 2006), whereas conjunctival swab PCR shows positive results within six weeks after infection (Strauss-Ayali et al., 2004). All dogs in which PCR results were negative had negative/doubtful or low antibody titres ($n = 3$). Two dogs with negative PCR results and low antibody titre showed no signs of leishmaniasis. In these patients, antibody titre likely indicates exposure rather than infection or cross reaction with other infectious agents. One dog, however, was symptomatic; in this dog, a false negative PCR result has to be considered.

Thirty seven of the dogs included in the study showed signs compatible with leishmaniasis and were, therefore, classified as symptomatic; 13 of 17 asymptomatic infected dogs and 22 of 26 infected dogs with signs of leishmaniasis tested positive by conjunctival swab PCR. Frequency of positive conjunctival swab PCR did not correlate with the clinical status in these dogs. In another study, also no association between clinical status and PCR results, including PCR of conjunctival swab, could be found (Lombardo et al., 2012).

One limitation of the study was that due to owner constraint not all tissue samples were obtained in each patient. In this study, bone marrow PCR was considered the gold standard of testing as it was reported to be highly sensitive (Andrade et al., 2002). However, two dogs were tested positive in conjunctival swab PCR, but not in bone marrow PCR. As it can be assumed that these dogs were truly infected, it is questionable if bone marrow PCR indeed should be considered as gold standard.

The results of the present study indicate that conjunctival swabs, which are easier and less invasively obtained than other samples and therefore readily accepted by owners, are a good diagnostic tool to diagnose a *Leishmania* infection in dogs. As sensitivity in this study was very high, conjunctival swab PCR can be considered a very useful diagnostic sample not only in endemic but also in non-endemic areas.

Acknowledgements: All authors declare no conflict of interest.

Table 1: Patients grouped according to the number of clinical signs in asymptomatic (no clinical signs), oligosymptomatic (1-2 clinical signs) and polysymptomatic (≥ 3 clinical signs), infected dogs with positive conjunctival swab PCR, with positive bone marrow PCR, and with detectable antibodies. More severe clinical status, assessed by number of clinical signs was not associated with positive conjunctival swab PCR result ($p = 0.930$).

	asymptomatic	oligosymptomatic	polysymptomatic	total
total	37	14	23	74
<i>Leishmania</i>-infected				
<i>infected/investigated</i>	17/37	11/14	15/23	58.1 % (43/74)
conjunctival swab PCR				
<i>PCR-positive/infected</i>	13/17	10/11	12/15	81.3 % (35/43)
bone marrow PCR				
<i>PCR-positive/infected</i>	7/9	2/2	8/8	89.9 % (17/19)
antibodies				
<i>antibody-positive/infected</i>	14/14	9/10	12/13	94.5 % (35/37)

Table 2: Number of dogs, in which the respective combination of PCR results of conjunctival swab, bone marrow, lymph node, and blood were obtained; + positive test result, - negative test result

conjunctival swab	bone marrow	blood	lymph node	number of dogs
+	+			9
+	-			2
-	+			6
-	-			30
+		+		13
+		-		12
-		-		1
+			+	17
+			-	1
+		+	+	8
+		-	+	9
+		-	-	1

Table 3: Number of dogs in each antibody titre group determined by IFA ($n = 28$) or ELISA ($n = 23$) and comparison between antibody titre group and infection status and conjunctival swab PCR results. Dogs with high antibody titres were more likely to be positive on PCR of conjunctival swabs than dogs with negative or doubtful antibody-titres ($p < 0.001$). conjunctival swab (CS), polymerase chain reaction (PCR), number of dogs (n)

antibody titre	antibody titre <i>IFA</i>	<i>n</i>	antibody titre <i>ELISA</i>	<i>n</i>	dogs total <i>n</i> = 51	dogs infected <i>n</i> = 37	dogs with positive CS PCR <i>n</i> = 31
negative	0	7	< 7.0	3	10	4	2
doubtful	1:32	6	7.0 – 12.0	1	7	2	2
low	1:64 – 1:128	5	> 12.0 – 30.0	5	10	7	6
medium	1:256 – 1:512	9	> 30.0 – 60.0	4	13	13	10
high	> 1:512	1	> 60.0	10	11	11	11

References

- Andrade, H.M., de Toledo Vde, P., Marques, M.J., Franca Silva, J.C., Tafuri, W.L., Mayrink, W., Genaro, O., 2002. Leishmania (Leishmania) chagasi is not vertically transmitted in dogs. *Vet Parasitol* 103, 71-81.
- Baneth, G., Koutinas, A.F., Solano-Gallego, L., Bourdeau, P., Ferrer, L., 2008. Canine leishmaniosis - new concepts and insights on an expanding zoonosis: part one. *Trends Parasitol* 24, 324-330.
- De Almeida Ferreira, S., Leite, R.S., Ituassu, L.T., Almeida, G.G., Souza, D.M., Fujiwara, R.T., de Andrade, A.S., Melo, M.N., 2012. Canine skin and conjunctival swab samples for the detection and quantification of Leishmania infantum DNA in an endemic urban area in Brazil. *PLoS Neglected Tropical Diseases* 6, e1596.
- Ferreira Ede, C., de Lana, M., Carneiro, M., Reis, A.B., Paes, D.V., da Silva, E.S., Schallig, H., Gontijo, C.M., 2007. Comparison of serological assays for the diagnosis of canine visceral leishmaniasis in animals presenting different clinical manifestations. *Vet Parasitol* 146, 235-241.
- Ferreira Sde, A., Ituassu, L.T., de Melo, M.N., de Andrade, A.S., 2008. Evaluation of the conjunctival swab for canine visceral leishmaniasis diagnosis by PCR-hybridization in Minas Gerais State, Brazil. *Vet Parasitol* 152, 257-263.
- Fisa, R., Riera, C., Gallego, M., Manubens, J., Portus, M., 2001. Nested PCR for diagnosis of canine leishmaniosis in peripheral blood, lymph node and bone marrow aspirates. *Vet Parasitol* 99, 105-111.
- Francino, O., Altet, L., Sanchez-Robert, E., Rodriguez, A., Solano-Gallego, L., Alberola, J., Ferrer, L., Sanchez, A., Roura, X., 2006. Advantages of real-time PCR assay for diagnosis and monitoring of canine leishmaniosis. *Vet Parasitol* 137, 214-221.
- Gomes, Y.M., Paiva Cavalcanti, M., Lira, R.A., Abath, F.G., Alves, L.C., 2008. Diagnosis of canine visceral leishmaniasis: biotechnological advances. *Vet J* 175, 45-52.
- Lachaud, L., Marchergui-Hammami, S., Chabbert, E., Dereure, J., Dedet, J.P., Bastien, P., 2002. Comparison of six PCR methods using peripheral blood for detection of canine visceral leishmaniasis. *J Clin Microbiol* 40, 210-215.
- Landis, J.R., Koch, G.G., 1977. The measurement of observer agreement for categorical data. *Biometrics* 33, 159-174.
- Leite, R.S., Ferreira Sde, A., Ituassu, L.T., de Melo, M.N., de Andrade, A.S., 2010. PCR diagnosis of visceral leishmaniasis in asymptomatic dogs using conjunctival swab samples. *Vet Parasitol* 170, 201-206.
- Lombardo, G., Pennisi, M.G., Lupo, T., Migliazzo, A., Capri, A., Solano-Gallego, L., 2012. Detection of Leishmania infantum DNA by real-time PCR in canine oral and conjunctival swabs and comparison with other diagnostic techniques. *Vet Parasitol* 184, 10-17.
- Maia, C., Campino, L., 2008. Methods for diagnosis of canine leishmaniasis and immune response to infection. *Vet Parasitol* 158, 274-287.
- Maia, C., Ramada, J., Cristovao, J.M., Goncalves, L., Campino, L., 2009. Diagnosis of canine leishmaniasis: conventional and molecular techniques using different tissues. *Vet J* 179, 142-144.
- Manna, L., Vitale, F., Reale, S., Caracappa, S., Pavone, L.M., Morte, R.D., Cringoli, G., Staiano, N., Gravino, A.E., 2004. Comparison of different tissue sampling for PCR-based diagnosis and follow-up of canine visceral leishmaniosis. *Vet Parasitol* 125, 251-262.
- Mettler, M., Grimm, F., Naucke, T.J., Maasjost, C., Deplazes, P., 2005. Canine leishmaniosis in Central Europe: retrospective survey and serological study of imported and travelling dogs. *Berl Munch Tierarztl Wochenschr* 118, 37-44.
- Naucke, T.J., Lorentz, S., 2012. First report of venereal and vertical transmission of canine leishmaniosis from naturally infected dogs in Germany. *Parasit Vectors* 5, 67.
- Oliva, G., Scalone, A., Foglia Manzillo, V., Gramiccia, M., Pagano, A., Di Muccio, T., Gradoni, L., 2006. Incidence and time course of Leishmania infantum infections examined by

parasitological, serologic, and nested-PCR techniques in a cohort of naive dogs exposed to three consecutive transmission seasons. *J Clin Microbiol* 44, 1318-1322.

Papadogiannakis, E.I., Koutinas, A.F., Saridomichelakis, M.N., Vlemmas, J., Lekkas, S., Karameris, A., Fytianou, A., 2005. Cellular immunophenotyping of exfoliative dermatitis in canine leishmaniosis (*Leishmania infantum*). *Vet Immunol Immunopathol* 104, 227-237.

Pilatti, M.M., Ferreira Sde, A., de Melo, M.N., de Andrade, A.S., 2009. Comparison of PCR methods for diagnosis of canine visceral leishmaniasis in conjunctival swab samples. *Res Vet Sci* 87, 255-257.

Shaw, S.E., Lerga, A.I., Williams, S., Beugnet, F., Birtles, R.J., Day, M.J., Kenny, M.J., 2003. Review of exotic infectious diseases in small animals entering the United Kingdom from abroad diagnosed by PCR. *Vet Rec* 152, 176-177.

Solano-Gallego, L., Koutinas, A., Miro, G., Cardoso, L., Pennisi, M.G., Ferrer, L., Bourdeau, P., Oliva, G., Baneth, G., 2009. Directions for the diagnosis, clinical staging, treatment and prevention of canine leishmaniosis. *Vet Parasitol* 165, 1-18.

Strauss-Ayali, D., Jaffe, C.L., Burshtain, O., Gonen, L., Baneth, G., 2004. Polymerase chain reaction using noninvasively obtained samples, for the detection of *Leishmania infantum* DNA in dogs. *J Infect Dis* 189, 1729-1733.

Tanczos, B., Balogh, N., Kiraly, L., Biksi, I., Szeredi, L., Gyurkovsky, M., Scalone, A., Fiorentino, E., Gramiccia, M., Farkas, R., 2012. First record of autochthonous canine leishmaniasis in Hungary. *Vector borne and zoonotic dis* 12, 588-594.

Teske, E., van Knapen, F., Beijer, E.G., Slappendel, R.J., 2002. Risk of infection with *Leishmania* spp. in the canine population in the Netherlands. *Acta Vet Scand* 43, 195-201.

V. DISKUSSION

Bei an Leishmaniose erkrankten Hunden können eine Vielzahl von klinischen Symptomen und labordiagnostischen Veränderungen auftreten. Die Prognose eines individuellen Patienten ist deshalb schwierig einzuschätzen. Im Moment wird empfohlen, die Patienten an Hand der Antikörpertiter-Höhe, klinischer Symptome und labordiagnostischer Veränderungen einzuteilen (SOLANO-GALLEGO et al., 2009). Es ist jedoch wenig über die Aussagekraft einzelner Parameter bekannt. Welche Veränderungen die Überlebenszeit negativ beeinflussen und somit zu einer schlechteren Prognose führen, ist unklar. In der ersten Studie der Arbeit sollten klinische Symptome und labordiagnostische Parameter ermittelt werden, die einen Einfluss auf die Prognose des Patienten haben. Die Daten von Patienten mit einer natürlichen *L.-infantum*-Infektion wurden hierzu retrospektiv ausgewertet.

Nahezu alle Patienten der Studie stammten aus einem endemischen Gebiet und wurden von dort nach Deutschland importiert oder hatten einen Reisevorbericht. Zwei Hunde waren jedoch nie im Ausland gewesen. Trotz einiger Fallberichte die dokumentieren, dass Hunde mit Leishmaniose vorher nie im Ausland waren (DUPREY et al., 2006; NAUCKE & LORENTZ, 2012; TANCZOS et al., 2012), wird das Risiko einer autochthonen Infektion in einem nicht-endemischen Gebiet gering eingeschätzt. Einer der Hunde hatte engen Kontakt zu einem an Leishmaniose erkrankten Partnerhund. Bei diesem Tier ist eine direkte Übertragung des Erregers, die in Einzelfällen beschrieben, in experimentellen Studien aber noch nicht belegt wurde, wahrscheinlich (DIAZ-ESPINEIRA & SLAPPENDEL, 1997; DUPREY et al., 2006). Der andere Hund wurde als Familienhund hauptsächlich im Haus gehalten. In Südwestdeutschland wurde zwar in einigen Gebieten das Auftreten einer Sandmückenspezies, *Phlebotomus mascittii*, dokumentiert (NAUCKE & PESSON, 2000), eine Reise oder längerer Aufenthalt in diesen Gebieten konnte für den Patienten aber ausgeschlossen werden. Über kurze Distanzen und bei günstigen Umgebungsbedingungen ist es möglich, mit *Leishmania* infizierte Sandmücken in ein vorher nicht-endemisches Gebiet einzuschleppen (BOGDAN et al., 2001). Eine Infektion durch eine mit Auto oder Flugzeug eingeführte Mücke ist jedoch sehr unwahrscheinlich, da der Vektor sehr temperatursensibel ist und einen Transport in der Regel nicht

überlebt. Nichts desto trotz lebte der Hund nicht in der Nähe eines Flughafen oder einer vielbefahrenen Autobahn. Andere mögliche Übertragungswege, wie eine kontaminierte Bluttransfusion (DE FREITAS et al., 2006) oder eine kongenitale Übertragung (ROSYPAL et al., 2005) konnten ebenfalls ausgeschlossen werden. Somit konnte der Infektionsweg dieses Patienten nicht ermittelt werden.

Das mittlere Alter der in der Studie untersuchten Patienten war mit 8,1 Jahren ungewöhnlich hoch. In der Literatur sind zwei Altersgruppen mit einem erhöhten Risiko, eine klinisch manifeste Leishmaniose zu entwickeln, beschrieben (ABRANCHES et al., 1991b; CARDOSO et al., 2004). Bei der ersten Gruppe handelt es sich um junge Tiere bis zu einem Alter von drei Jahren, bei denen erste klinische Symptome bereits kurz nach der Infektion auftreten. Im Gegensatz dazu sind die Patienten der zweiten Gruppe deutlich älter. Diese Tiere sind über einen langen Zeitraum mit dem Erreger infiziert, ohne eine klinische Erkrankung zu entwickeln. Kommt es jedoch zu einer Veränderung des Immunstatus und einer vermehrt Th2-gewichteten Immunantwort, kann es zu einer Aktivierung der latenten Infektion kommen (PINELLI et al., 1994; BARBIERI, 2006). Viele der in der Studie untersuchten Hunde wurden aus einem endemischen Gebiet, wie Italien oder Spanien, nach Deutschland gebracht. Dramatisch veränderte Klima- und Umweltbedingungen, die Bestandteil eines solchen Imports und einer anschließenden Vermittlung in Deutschland sind, können zu einer Immunsuppression geführt und damit zur Entstehung klinischer Symptome beigetragen haben. Es kann auch davon ausgegangen werden, dass junge, offensichtlich erkrankte Hunde in der Regel nicht vermittelt werden. Beide vorangegangenen erwähnten Faktoren sind vermutlich am hohen medianen Alter der Hunde in der hier untersuchten Population beteiligt. Die Ergebnisse legen eine unterschiedliche Altersverteilung in endemischen (CIARAMELLA et al., 1997) und nicht-endemischen Gebieten nahe.

Entgegen der Annahme, dass ein enger Zusammenhang zwischen der Höhe der Antikörperkonzentration und der Prognose besteht, hatte die Höhe des Antikörpertiters in dieser Studie keinen Einfluss auf die Überlebenszeit der Patienten. Alle bisherigen Untersuchungen wurden in endemischen Gebieten durchgeführt, in denen eine Super- oder Reinfektion der Patienten nicht ausgeschlossen werden kann. Der in einem endemischen Gebiet kontinuierlich herrschende Infektionsdruck führt zu einer höheren Erregerbelastung des

einzelnen Patienten. In Studien wurde ein Zusammenhang zwischen der Erregerdichte und einem schlechten klinischen Gesundheitszustand beschrieben, der durch eine vermehrte Immunstimulation erklärt wird (REIS et al., 2006b). Außerdem kann eine breitere genetische Varianz des Erregers, die einen Einfluss auf die Pathogenität des Parasiten haben kann, eine Rolle gespielt haben. In der Humanmedizin, in der Leishmaniose vor allem ein Problem in Schwellen- und Entwicklungsländern ist, spielen Umweltbedingungen eine wichtige Rolle. Bessere Lebensbedingungen, ein besserer Ernährungszustand und das reduzierte Risiko einer Co-Infektion mit einem anderen Erreger, können in dieser Studie zusätzliche Einflussfaktoren gewesen sein. Es ist deshalb möglich, dass die Überlebenszeit in nicht-endemischen Gebieten weniger von der Antikörperkonzentration beeinflusst wird als in endemischen Gebieten.

In der Arbeit wurden mehrere labordiagnostische Veränderungen ermittelt, die mit einer verkürzten Überlebenszeit verbunden waren. Proteinurie scheint ein sehr guter prognostischer Parameter zu sein. Hunde mit Proteinurie hatten eine mediane Überlebenszeit von 795 Tagen, während Patienten ohne Proteinurie 3.064 Tage lebten. Es gibt nur wenige Informationen über die Inzidenz von Proteinurie bei natürlich infizierten Patienten. Histologische Veränderungen, die im Rahmen einer Glomerulonephritis auftreten, können jedoch häufig postmortal nachgewiesen werden (COSTA et al., 2003; ZATELLI et al., 2003). Es ist belegt, dass eine persistierende Proteinurie nicht nur Hinweis für eine glomeruläre Schädigung, sondern auch mit einer erhöhten Morbidität und Mortalität verbunden ist (LEES et al., 2005). Aus diesem Grund ist die Proteinurie, die durch ein erhöhtes UP/C definiert ist, auch Teil des von Solano-Gallego et al. (2009) beschriebenen Stagings von an Leishmaniose erkrankten Patienten (SOLANO-GALLEGO et al., 2009). Das Ergebnis der Studie betont, wie wichtig es ist, eine Proteinurie frühzeitig zu erkennen und zu behandeln, um das Fortschreiten eines glomerulären Schadens zu einer sekundären chronischen Niereninsuffizienz zu verhindern oder zumindest zu verlangsamen. Im fortgeschrittenen Stadium einer Glomerulonephritis kann es durch die persistierende Proteinurie zu einem sekundären tubulären Schaden kommen, der sich in einem Anstieg der Nierenwerte ausdrückt. Auch eine renale Azotämie war in dieser Studie mit einer verkürzten Überlebenszeit verbunden.

Hypalbuminämie ist ein weiterer guter prognostischer Parameter. Da bei den in der Studie untersuchten Hunden häufig eine Proteinurie festgestellt wurde, ist die Hypalbuminämie wahrscheinlich auf den persistierenden renalen Verlust zurückzuführen. Dieser Verlust gibt Hinweis auf eine glomeruläre Schädigung, die offensichtlich mit einer schlechteren Prognose verbunden war. Albumin ist zudem ein negatives Akute-Phase-Protein, dessen Bildung während einer akuten-Phase-Antwort abnimmt. Akute-Phase-Proteine, wie Haptoglobin, C-reaktives Protein und Serum-Amyloid A, sind Marker für das Fortschreiten der Erkrankung nach einer *Leishmania*-Infektion (MARTINEZ-SUBIELA et al., 2011). Ein Abfall der Albuminkonzentration im Blut kann auch Ausdruck einer klinischen Verschlechterung des Patienten sein. Bei Intensivpatienten wurde sowohl in der Human- als auch in der Tiermedizin dokumentiert, dass eine reduzierte Albuminkonzentration bei vielen Erkrankungen mit einer schlechteren Prognose verbunden ist (WEINKLE et al., 2005; LAI et al., 2011). Albumin erfüllt zahlreiche wichtige physiologische Funktionen, es bindet und transportiert unter anderem Hormone und Medikamente und erhält den kolloidosmotischen Druck. Es wurde aus diesem Grund Bestandteil vieler Scoring-Systeme, mit denen schwer erkrankte Patienten klassifiziert werden (WHITTEMORE et al., 2011). Alle oben erwähnten Faktoren können zur deutlich verkürzten Überlebenszeit von fast vier Jahren bei Hunden mit Hypalbuminämie im Vergleich zu Patienten mit einer normalen Albuminkonzentration beigetragen haben.

Eine Lymphopenie wurde bei 28 % der untersuchten Patienten diagnostiziert. Wenn nur Patienten, die eine Therapie gegen eine *Leishmania*-Infektion erhalten hatten, in die Auswertung einbezogen wurden, war die Lymphozytenzahl ebenfalls mit der Überlebenszeit korreliert. Während Patienten, bei denen eine Lymphopenie festgestellt wurde, median nur 251 Tage lebten, betrug die mediane Überlebensdauer bei Patienten mit einer Lymphozytenzahl im Referenzbereich 1.948 Tage. Die protektive zelluläre Immunantwort nach einer *Leishmania*-Infektion wird durch CD4⁺-T-Zellen vermittelt. Symptomatische Tiere leiden an einer zunehmenden Immunsuppression, die durch die Abnahme der im peripheren Blut zirkulierenden CD4⁺-Lymphozyten (GUERRA et al., 2009) und einen Abfall des CD4⁺/CD8⁺-Verhältnis gekennzeichnet ist (BOURDOISEAU et al., 1997a). In der Humanmedizin ist der Rückgang der CD4⁺-T-Zellen mit einem erhöhten Risiko, an opportunistischen Infektionen zu erkranken, verbunden (ABBAS et al.,

2007). Die verschiedenen Lymphozytenklassen wurden in dieser Studie nicht bestimmt, die Lymphopenie könnte aber eine zunehmende Immunsuppression widerspiegeln. Es muss auch in Betracht gezogen werden, dass Stress, der durch eine klinische Verschlechterung des Patienten auftritt, zu einem sogenannten Stressleukogramm führen kann. Dieses ist auch durch eine reduzierte Lymphozytenzahl im peripheren Blut gekennzeichnet.

Eine Anämie, die bei an Leishmaniose erkrankten Hunden häufig ist, (CIARAMELLA et al., 1997) hatte in dieser Studie keinen Einfluss auf die Überlebenszeit der Patienten. Eine mögliche Erklärung ist, dass bei nur drei Patienten eine aregenerative Anämie, die durch eine Knochenmarkssuppression oder chronische Niereninsuffizienz ausgelöst werden kann, festgestellt wurde. Die Mehrheit der Patienten zeigte Hinweise auf ein regeneratives Geschehen, dessen Ursachen Blutungen bei Ulzerationen oder Vaskulitiden oder auch eine immunmedierte Zerstörung der Erythrozyten sein können.

Eine Panzytopenie, die Hinweis auf das Vorliegen einer Myelodysplasie geben kann, wurde bei vier Patienten diagnostiziert. Dieser Befund war jedoch nicht mit einer schlechteren Prognose verbunden. Dies mag zum einen an der geringen Patientenzahl liegen, die einen Vergleich schwierig macht. Zum anderen wird eine Myelodysplasie mit den Th1-assoziierten Zytokinen INF- γ und TNF- α in Verbindung gebracht (FOGLIA MANZILLO et al., 2006), die bei *Leishmania*-infizierten Hunden aber zu einer protektiven Immunität beitragen.

Hunde, die zusätzlich zu einer Infektion mit *Leishmania infatum* mit einem anderen pathogenen Erreger infiziert sind, haben ein erhöhtes Risiko eine klinisch manifeste Leishmaniose zu entwickeln (SOLANO-GALLEGU et al., 2009). Dennoch war die Co-Infektion mit *Babesia canis* oder *Ehrlichia canis* in dieser Studie nicht mit einer verkürzten Überlebenszeit korreliert. Alle Hunde mit einer Infektion mit *B. canis* oder *E. canis* wurden entsprechend behandelt. Da bei einer klinisch manifesten Babesiose und Ehrlichiose eine Erregerelimination möglich ist (BOOZER & MACINTIRE, 2003; EDDLESTONE et al., 2007), ist es wahrscheinlich, dass die Langzeitprognose bei einer chronischen Leishmaniose durch eine Co-Infektion nicht maßgeblich beeinflusst wird, falls diese adäquat therapiert wird.

Die Therapie einer *Leishmania*-Infektion führt nur zu einer zeitlich begrenzten klinischen Heilung und selten, wenn überhaupt, zur Erregerelimination (NOLI & AUXILIA, 2005). Es war deshalb auch Ziel dieser Studie herauszufinden, ob eine Therapie von Patienten, bei denen eine Reinfektion mit dem Parasiten sehr unwahrscheinlich ist, zu einer verlängerten Überlebenszeit führt. Mehr als 50 % der in die Studie eingeschlossenen Hunde wurden therapiert. Hunde, die eine Therapie erhalten hatten, lebten 1.900 Tage länger als Hunde, die nicht behandelt wurden. Eine Behandlung führt zwar nicht zur vollkommenden Erregerfreiheit, kann aber die Vermehrung der Leishmanien kontrollieren und somit die Belastung des Patienten reduzieren. Dies kann zu einer längeren Überlebenszeit beitragen. Die meisten der nicht therapierten Patienten verstarb innerhalb von 14 Tagen nach der Erstvorstellung an der Klinik oder wurde euthanasiert. Dies war ein Hauptgrund für die deutlich längere Überlebenszeit der therapierten Hunde. Da es keine pathognomonischen Symptome für Leishmaniose gibt und viele klinische und labordiagnostische Veränderungen beschrieben sind, ist es möglich, dass bereits lange bestehende Auffälligkeiten von den Besitzern oder überweisenden Tierärzten fehlinterpretiert oder übersehen wurden. Dies kann dazu geführt haben, dass diese Hunde erst in einem sehr fortgeschrittenen Stadium der Erkrankung vorgestellt wurden. Der bereits stark beeinträchtigte Gesundheitszustand des Tieres kann den behandelnden Tierarzt beeinflusst haben, keine Therapie der *Leishmania*-Infektion anzuraten, sondern den Patienten zu euthanasieren. Auch die Besitzer können bei einem Hund mit einer hochgradig reduzierten Lebensqualität und einer schlechten Prognose von einer kostenintensiven Therapie abgesehen haben. Wenn die Patienten, die innerhalb der ersten zwei Wochen nach Vorstellung an der Klinik verstorben sind oder euthanasiert wurden, nicht in die Auswertung einbezogen wurden, erhielten nur drei der in die Studie eingeschlossenen Hunde keine Therapie. Ein Vergleich der Überlebenszeiten von therapierten und nicht therapierten Hunden war aus diesem Grund nicht möglich.

In dieser Studie konnte kein Unterschied zwischen den Überlebenszeiten von Hunden, die ausschließlich mit Allopurinol und Hunden, die mit einer Kombinationstherapie aus Allopurinol und N-Methyl-Glucamin-Antimonat behandelt wurden, gefunden werden. Dieses Ergebnis ist unerwartet, da Allopurinol in Studien, in denen es als Monotherapie eingesetzt wurde, nur eine geringe Effektivität hatte (OLIVA et al., 2010). Es wird außerdem berichtet, dass

mit einer Kombination von Antimonaten und Allopurinol ein besserer Therapieerfolg erzielt werden kann als mit dem jeweiligen Medikament allein (DENEROLLE & BOURDOISEAU, 1999). Einschränkend muss gesagt werden, dass starke Dosisunterschiede und eine unterschiedliche Therapiedauer einen Vergleich zwischen einer Mono- oder Kombinationstherapie erschweren. Die Ergebnisse sind deshalb nur eingeschränkt zu beurteilen.

Es sind viele Nachweisverfahren zur Diagnose einer caninen Leishmaniose beschrieben. Antikörperrnachweisverfahren, wie der IFA oder ELISA, werden häufig eingesetzt, haben aber vor allem bei asymptomatischen Tieren oder kurz nach der Infektion keine ausreichende Sensitivität (GOMES et al., 2008). Die Knochenmarks-PCR gilt auf Grund der hohen Sensitivität als Goldstandard zur Diagnosestellung (ANDRADE et al., 2002). Da eine Knochenmarkspunktion invasiv und in der Regel nur unter Vollnarkose möglich ist, besteht ein zunehmendes Interesse an nicht-invasiven PCR-Proben. Eine PCR aus Konjunktivalupfern hatte in ersten Studien eine hohe Sensitivität (STRAUSS-AYALI et al., 2004; LEITE et al., 2010). Es gibt jedoch keine Studie in einem nicht-endemischen Gebiet, in dem die Erregerzahl niedriger sein kann, da Reinfektionen ausgeschlossen sind. Im zweiten Teil der Arbeit sollte deshalb die Sensitivität und Spezifität einer PCR aus Konjunktivalupfern zur Diagnose einer *Leishmania*-Infektion bei symptomatischen und asymptomatischen Patienten in einem nicht-endemischen Gebiet ermittelt und mit Werten aus endemischen Gebieten verglichen werden.

Die Sensitivität der PCR aus Konjunktivalupfern lag in dieser Studie bei 78,4 %. Dies ist vergleichbar mit den Ergebnissen aus endemischen Gebieten. Je nach PCR-Protokoll, das zur Amplifizierung der *Leishmania*-DNA eingesetzt wurde, und der untersuchten Patientengruppe schwankte die Sensitivität zwischen 43,0 % und 95,6 % (STRAUSS-AYALI et al., 2004; FERREIRA SDE et al., 2008; PILATTI et al., 2009; LEITE et al., 2010; LOMBARDO et al., 2012). Das Ergebnis dieser Studie legt nahe, dass die PCR aus Konjunktivalupfern ein gutes Nachweisverfahren zur Diagnose Leishmaniose in einem nicht-endemischen Gebiet ist.

Nach der Infektion wird der Parasit durch infizierte Makrophagen in lymphoretikuläres Gewebe verbreitet. Da in der Konjunktiva zahlreiche Lymphfollikel liegen, die das Auge vor unterschiedlichen Erregern schützen

sollen, kann sie als aktives peripheres lymphoides Organ angesehen werden. Deshalb kann der Parasit in diesem Gewebe gefunden werden. Es wird zudem davon ausgegangen, dass *Leishmania* spp. einen starken Hauttropismus besitzt (PAPADOGIANNAKIS et al., 2005). Da die Konjunktiva den Hautstrukturen sehr eng anliegt, kann die Nachweisbarkeit des Parasiten auch durch diesen Tropismus erklärt werden.

Die PCR aus Knochenmarkspunktat hat die höchste Sensitivität für die Diagnose einer *Leishmania*-Infektion und gilt deshalb als Goldstandard (MAIA & CAMPINO, 2008). In dieser Studie hatten sechs Hunde einen positiven Erregernachweis im Knochenmark, während die PCR aus Konjunktivaltupfern negativ war. Eine mögliche Erklärung ist eine unterschiedliche Erregerzahl in den verschiedenen Geweben, die eine unterschiedliche Verbreitung der Leishmanien im Wirtsorganismus widerspiegeln kann. Da bei der Entnahme von Konjunktivaltupfern nur Zellen entnommen werden, die leicht von der Oberfläche abschilfern, ist es auch möglich, dass infizierte Makrophagen mit dieser Methode nicht erfasst werden. In einer neuen Studie wurde berichtet, dass die PCR aus Konjunktivaltupfern ebenso sensitiv wie eine Knochenmarks-PCR ist (DE ALMEIDA FERREIRA et al., 2012). Dies konnte in dieser Studie nicht bestätigt werden. Bei zwei Hunden wurde Leishmanien-DNA in der Konjunktiva nachgewiesen, die Untersuchung des Knochenmarks war jedoch negativ. Obwohl sie keine Symptome der Erkrankung zeigten, ist es sehr wahrscheinlich, dass beide Hunde tatsächlich mit *Leishmania infantum* infiziert waren. Konjunktivaltupfer werden wenige Wochen nach einer Infektion positiv (STRAUSS-AYALI et al., 2004). Es könnte sich bei den Hunden deshalb um eine frühe Infektion handeln, die das Knochenmark noch nicht befallen hatte.

Lymphknotenaspirate gelten als sensitives Material zum Nachweis von Erreger-DNA bei infizierten Hunden (MANNA et al., 2004; MAIA & CAMPINO, 2008). Die beste Übereinstimmung von in der Studie untersuchten Materialien konnte zwischen Lymphknotenaspiraten und Konjunktivaltupfern beobachtet werden. Dies ist auch in anderen Studien beschrieben worden (LOMBARDO et al., 2012). Da bei beiden Proben peripheres lymphoides Gewebe entnommen wird, ist die gute Übereinstimmung wahrscheinlich auf dasselbe Infektionsstadium zurückzuführen.

Im Gegensatz dazu wurde in der Arbeit eine deutliche Diskrepanz zwischen den

Ergebnissen der PCR aus Blut und aus Konjunktivalupfern festgestellt. Von 25 Hunden, die im Konjunktivalupfer positiv getestet wurden, konnte nur bei 13 auch im Blut *Leishmania*-DNA nachgewiesen werden. Die Aussagekraft von Blut zur Diagnose einer caninen Leishmaniose wird kontrovers diskutiert. Einerseits wurde gezeigt, dass Blut ein gutes Probenmaterial zur PCR-basierten Diagnosestellung ist (FISA et al., 2001; MANNA et al., 2004), andererseits treten Schwierigkeiten bei der DNA-Aufbereitung und mit Inhibitoren der Amplifikationsreaktion auf, die die Sensitivität des Verfahrens deutlich einschränken (LACHAUD et al., 2002b; DE ALMEIDA FERREIRA et al., 2012).

In nicht-endemischen Gebieten werden zunehmend autochthone Infektionen bei Hunden mit Symptomen einer caninen Leishmaniose, aber ohne Reisevorbericht beschrieben. Zuverlässige Verfahren zum Nachweis einer *Leishmania*-Infektion werden deshalb immer wichtiger. Es ist wenig über die Prävalenz von Leishmaniose in nicht-endemischen Regionen bekannt. Es kann aber davon ausgegangen werden, dass sie deutlich niedriger ist als in endemischen Gebieten. Unter diesen Umständen würde der negative prädiktive Wert der Untersuchung noch höher als in dieser Studie beschrieben. Die PCR aus Konjunktivalupfer kann deshalb als nicht-invasiver Test zum Ausschluss einer Erkrankung in einem nicht-endemischen Gebiet eingesetzt werden.

Bei 35 in die Studie eingeschlossenen Hunden konnten Antikörper nachgewiesen werden. Von 17 Hunden mit einem negativen oder fraglichen Antikörpernachweis wurden vier mittels Konjunktivalupfer PCR positiv auf *L.-infantum*-DNA getestet. Dies ist durch eine unterschiedliche Infektionsdauer zu erklären. Die Bildung von Antikörpern kann bei infizierten Hunden Monate bis Jahre dauern (OLIVA et al., 2006), während ein Erregernachweis aus der Konjunktiva bereits nach sechs Wochen möglich ist (STRAUSS-AYALI et al., 2004). Alle Hunde, bei denen Antikörper nachgewiesen wurden, deren PCR-Ergebnisse jedoch negativ waren, hatten einen niedrigen Antikörpertiter. Drei dieser Hunde zeigten keine klinischen Symptome einer caninen Leishmaniose. Wahrscheinlich spiegeln die Antikörper in diesen Fällen eher einen Erregerkontakt als eine wirkliche Infektion wieder. Hunde mit einem hohen Antikörpertiter waren mit einer höheren Wahrscheinlichkeit positiv im Konjunktivalupfer als Hunde mit einem negativen oder fraglichen Antikörpertiter. Eine mögliche Erklärung ist eine höhere Zahl von im Gewebe nachweisbaren Parasiten, die mit steigendem Antikörpertiter auch

zunimmt (LOMBARDO et al., 2012).

37 Hunde zeigten Symptome, die im Rahmen der caninen Leishmaniose auftreten können und wurden somit als symptomatisch klassifiziert. Bei 13 von 17 infizierten asymptomatischen Hunden und 22 von 26 infizierten symptomatischen Hunden konnte im Konjunktivaltupfer *Leishmania*-DNA nachgewiesen werden. In dieser Studie wurde also kein Zusammenhang zwischen einem positiven direkten Erregernachweis und der Zahl der klinischen Symptome nachgewiesen.

Beide Studien der Arbeit hatten Limitationen. In der ersten Studie wurde eine sehr heterogene Patientengruppe eingeschlossen; zum einen Patienten, die erst kürzlich diagnostiziert wurden, zum anderen solche, die bereits seit langem Symptome der Erkrankung zeigten. Die Einschlusskriterien waren nicht bei allen Patienten identisch. Die Diagnose „Leishmaniose“ wurde bei einem Teil der Patienten anhand eines Antikörpernachweis gestellt, bei anderen wurde ein direkter Erregernachweis durchgeführt. Da die Krankenakten der Patienten retrospektiv ausgewertet wurden, waren nicht für alle Hunde alle Daten bezüglich klinischer Symptome und labordiagnostischer Veränderung vorhanden. Die oben genannten Gründe können die Ergebnisse der Studie beeinflusst haben.

In der zweiten Studie wurden eine Knochenmarks-PCR auf Grund der hohen Sensitivität als Goldstandard zu Diagnose einer *Leishmania* Infektion angesehen. Dennoch waren zwei Hunde positiv im Konjunktivaltupfer und negativ im Knochenmark. Da davon auszugehen ist, dass beide Hunde tatsächlich mit dem Erreger infiziert waren, ist zu überlegen, ob eine Knochenmarks-PCR wirklich als Goldstandard angesehen werden darf. Es wurden außerdem nicht bei allen Tieren alle PCR-Proben gesammelt. Eine weitere Einschränkung der Studie ist, dass die Patienten nur anhand einer klinischen Untersuchung in symptomatisch und asymptomatisch eingeteilt wurden. In Anlehnung an kürzlich veröffentlichte Leitlinien sollte ein klinisches Staging neben der klinischen Untersuchung auch ein Blutbild, ein Serumorganprofil, Gerinnungsparameter sowie eine Urinuntersuchung umfassen (PALTRINIERI et al., 2010).

Zusammenfassend ist zu sagen, dass die Höhe des Antikörpertiters keinen Einfluss auf die Überlebenszeit der in der Studie untersuchten Patienten hatte und deshalb keine prognostische Aussagekraft besitzt. Labordiagnostische Parameter, die negativ mit der Überlebenszeit korreliert waren und sich deshalb gut eignen,

die Prognose eines Patienten einzuschätzen, sind Proteinurie, Hypalbuminämie, renale Azotämie und Lymphopenie. Da Hunde, die eine Therapie erhalten hatten, durchschnittlich 1.900 Tage länger lebten als Hunde, die nicht medikamentös behandelt wurden, ist die Therapie von infizierten Hunden in einem nicht-endemischen Gebiet indiziert. Die PCR aus Konjunktivaltupfern ist ein sensitiver nicht-invasiver Test zur Diagnose einer Leishmania Infektion in nicht-endemischen Gebieten. Er kann auch bei asymptomatischen Tieren eingesetzt werden, wenn die Besitzer nicht mit einer invasiven Diagnostik einverstanden sind.

VI. ZUSAMMENFASSUNG

Untersuchung zur Diagnose und Prognose der caninen Leishmaniose

Bei der vorliegenden Arbeit handelt es sich um eine kumulative Doktorarbeit, welche eine Publikation und ein Manuskript umfasst. Ziel des ersten Teils der Arbeit war zu evaluieren, ob der Antikörpertiter Einfluss auf die Prognose eines Patienten hat, und weitere prognostische Parameter der caninen Leishmaniose zu ermitteln. Es sollte zudem die Frage beantwortet werden, ob die Therapie infizierter Hunde, in einer Region, in der eine Reinfektion unwahrscheinlich ist, sinnvoll ist. Es wurden hierzu Patientendaten von 72 Hunden, die in den Jahren 2000 - 2008 an der Medizinischen Kleintierklinik der Ludwig-Maximilians-Universität München wegen einer *Leishmania*-Infektion vorgestellt wurden, retrospektiv ausgewertet. Einschlusskriterien waren ein positiver Antikörpernachweis oder ein direkter Erregernachweis mittels PCR oder Zytologie und ein von den Besitzern beantworteter ausführlicher Fragebogen. Alle in die Studie eingeschlossenen Hunde zeigten klinische Symptome und/oder hatten labordiagnostische Veränderungen, die bei caniner Leishmaniose auftreten können. Es konnte kein Zusammenhang zwischen der Höhe des im IFA gemessenen Antikörpertiters und der Überlebenszeit der Patienten festgestellt werden ($p = 0,982$). Dieses Ergebnis zeigt, dass der Antikörpertiter, anderes als bisher angenommen, kein prognostischer Faktor ist. Labordiagnostische Parameter, die bei therapierten Hunden mit einer verkürzten Überlebenszeit verbunden waren, waren Proteinurie ($p < 0,001$), renale Azotämie ($p < 0,001$), Hypoalbuminämie ($p = 0,002$) sowie Lymphopenie ($p = 0,040$). Die Behandlung von infizierten Tieren führte zu einer verlängerten Überlebenszeit ($p = 0,003$). Da Hunde, die eine Therapie erhalten hatten, durchschnittlich 1.900 Tage länger lebten als Hunde, die nicht medikamentös behandelt wurden, ist die Therapie von infizierten Hunden in einem nicht-endemischen Gebiet indiziert.

Im zweiten Teil der Arbeit wurde die Sensitivität und Spezifität einer PCR aus Konjunktivaltupfern in einem nicht-endemischen Gebiet untersucht. Hierzu wurden 74 Hunde, die wegen des Verdachts auf canine Leishmaniose ($n = 37$) oder nach einem Auslandsaufenthalt zum Ausschluss einer *Leishmania*-Infektion ($n = 37$) an der Medizinischen Kleintierklinik der Ludwig-Maximilians-Universität vorgestellt wurden, in einer prospektiven Studie eingeschlossen. Die Ergebnisse der PCR aus Konjunktivaltupfern wurden mit denen aus Knochenmark, Lymphknoten, Blut und dem Antikörpernachweis mittels IFA oder ELISA verglichen. Die Knochenmarks-PCR wurde als Goldstandard zur Diagnosestellung angesehen. Die PCR aus Konjunktivaltupfern hatte eine Sensitivität von 78,4 % und Spezifität von 83,3 % für die Diagnose canine Leishmaniose. Die Ergebnisse der PCR aus Konjunktivaltupfern und der PCR aus Lymphknotenaspiraten stimmten gut überein ($\kappa = 0.642$), wohingegen die Übereinstimmung zwischen der PCR aus Knochenmarksproben und der aus Konjunktivaltupfern nur moderat war ($\kappa = 0.483$). Die PCR aus Konjunktivaltupfern und Blut zeigte so gut wie keine Übereinstimmung ($\kappa = 0.070$). Hunde mit einem hohen Antikörpertiter hatten mit höherer Wahrscheinlichkeit eine positive Konjunktivaltupfer-PCR als Hunde mit negativem oder fraglichem Antikörpertiter ($p < 0,001$). Eine Korrelation zwischen positiver Konjunktivaltupfer-PCR und den klinischen Symptomen des Patienten konnte nicht gefunden werden. Die Ergebnisse der Studie zeigen, dass die PCR aus Konjunktivaltupfern ein guter nicht-invasiver Test ist, um eine *Leishmania*-Infektion in einem nicht-endemischen Gebiet zu diagnostizieren.

VII. SUMMARY

Studies on diagnosis and prognosis of canine Leishmaniasis

This cumulative doctoral thesis contains one publications and one manuscript. The aim of the first study was to determine which laboratory and clinical parameters can be used as prognostic factor, whether level of antibody titre is a prognostic factor, and whether treatment leads to a better prognosis in a country in which reinfection is extremely unlikely. Data of 72 dogs infected with *Leishmania infantum* that had been presented to the Clinic of Small Animal Medicine of LMU University of Munich, Germany and whose owners answered a detailed questionnaire, were reviewed retrospectively. Inclusion criterion was an infection with *L. infantum*. Infection was proven by either direct detection of the parasite by PCR or cytology and/or indirect detection of antibodies. All dogs included in the study had signs compatible with canine leishmaniasis. No correlation between the level of antibody titres (determined by IFA) and survival time was found ($p = 0.982$). This result indicates that other than expected antibody titre is of no prognostic value. However, there was a significant correlation between survival time and presence of proteinuria ($p < 0.001$), renal azotemia ($p < 0.001$), hypoalbuminemia ($p = 0.002$) and lymphopenia ($p = 0.040$) in all treated dogs. Furthermore treatment of diseased dogs resulted in a longer survival time ($p = 0.003$). As treatment was correlated with a longer survival of 1,900 days, it is indicated in infected dogs.

The aim of the second study was to detect sensitivity and specificity of conjunctival swab PCR in dogs in non-endemic areas. Seventy four dogs presented to the Clinic of Small Animal Internal Medicine of LMU University of Munich for suspected canine leishmaniasis ($n = 37$) or for screening purposes after a history of travelling ($n = 37$) were included in a prospective study. PCR results from conjunctival swabs were compared to those from bone marrow, lymph node, blood and to antibody result determined by IFA or ELISA. Sensitivity and specificity of conjunctival swab were 78.4 % and 83.3 %. There was substantial agreement between results from conjunctival swabs and lymph node ($\kappa = 0.642$), fair to moderate agreement between conjunctival swab and bone

marrow ($\kappa = 0.483$) and almost no agreement between results of conjunctival swab and blood ($\kappa = 0.070$). Dogs with high antibody titres were more likely to be positive on conjunctival swab PCR than dogs with negative or doubtful antibody titres ($p < 0.001$). No association between clinical status and positive conjunctival swab PCR was detected. Thus, conjunctival swab PCR is a good non-invasive test to diagnose a *Leishmania* infection.

VIII. LITERATURVERZEICHNIS

Abbas A, Chapter 20 - congenital and acquired immunodeficiencies, Section V - immunity in defense and disease, Cellular and Molecular Immunology 6th edn. Saunders (2007). 463-88

Abranches P, Santos-Gomes G, Rachamim N, Campino L, Schnur LF, Jaffe CL. An experimental model for canine visceral leishmaniasis. *Parasite Immunol* 1991a; 13: 537-50.

Abranches P, Silva-Pereira MC, Conceicao-Silva FM, Santos-Gomes GM, Janz JG. Canine leishmaniasis: pathological and ecological factors influencing transmission of infection. *J Parasitol* 1991b; 77: 557-61.

Alexandre-Pires G, Pais D, Correia M, Pina JA. Leishmaniosis--a report about the microvascular and cellular architecture of the infected spleen in *Canis familiaris*. *Microsc Res Tech* 2006; 69: 227-35.

Alvar J, Canavate C, Molina R, Moreno J, Nieto J. Canine leishmaniasis. *Adv Parasitol* 2004; 57: 1-88.

Alvar J, Velez ID, Bern C, Herrero M, Desjeux P, Cano J, Jannin J, den Boer M. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. *PloS One* 2012; 7: e35671.

Andrade HM, de Toledo Vde P, Marques MJ, Franca Silva JC, Tafuri WL, Mayrink W, Genaro O. *Leishmania (Leishmania) chagasi* is not vertically transmitted in dogs. *Vet Parasitol* 2002; 103: 71-81.

Baneth G, Aroch I. Canine leishmaniasis: a diagnostic and clinical challenge. *Vet J* 2008; 175: 14-5.

Baneth G, Koutinas AF, Solano-Gallego L, Bourdeau P, Ferrer L. Canine leishmaniosis - new concepts and insights on an expanding zoonosis: part one.

Trends Parasitol 2008; 24: 324-30.

Barbieri CL. Immunology of canine leishmaniasis. Parasite Immunol 2006; 28: 329-37.

Bates PA, Rogers ME. New insights into the developmental biology and transmission mechanisms of Leishmania. Current molecular medicine 2004; 4: 601-9.

Bates PA. Transmission of Leishmania metacyclic promastigotes by phlebotomine sand flies. Int J Parasitol 2007; 37: 1097-106.

Bogdan C, Schonian G, Banuls AL, Hide M, Pratlong F, Lorenz E, Rollinghoff M, Mertens R. Visceral leishmaniasis in a German child who had never entered a known endemic area: case report and review of the literature. Clin Infect Dis 2001; 32: 302-6.

Boggiatto PM, Ramer-Tait AE, Metz K, Kramer EE, Gibson-Corley K, Mullin K, Hostetter JM, Gallup JM, Jones DE, Petersen CA. Immunologic indicators of clinical progression during canine Leishmania infantum infection. Clin Vaccine Immunol 2010; 17: 267-73.

Boggiatto PM, Gibson-Corley KN, Metz K, Gallup JM, Hostetter JM, Mullin K, Petersen CA. Transplacental transmission of Leishmania infantum as a means for continued disease incidence in North America. PLoS neglected tropical diseases 2011; 5: e1019.

Boozer AL, Macintire DK. Canine babesiosis. Vet Clin North Am Small Anim Pract 2003; 33: 885-904.

Bourdoiseau G, Bonnefont C, Magnol JP, Saint-Andre I, Chabanne L. Lymphocyte subset abnormalities in canine leishmaniasis. Vet Immunol Immunopathol 1997a; 56: 345-51.

Bourdoiseau G, Marchal T, Magnol JP. Immunohistochemical detection of *Leishmania infantum* in formalin-fixed, paraffin-embedded sections of canine skin and lymph nodes. *J Vet Diagn Invest* 1997b; 9: 439-40.

Cabral M, O'Grady J, Alexander J. Demonstration of *Leishmania* specific cell mediated and humoral immunity in asymptomatic dogs. *Parasite Immunol* 1992; 14: 531-9.

Cabral M, O'Grady JE, Gomes S, Sousa JC, Thompson H, Alexander J. The immunology of canine leishmaniosis: strong evidence for a developing disease spectrum from asymptomatic dogs. *Vet Parasitol* 1998; 76: 173-80.

Cardoso L, Neto F, Sousa JC, Rodrigues M, Cabral M. Use of a leishmanin skin test in the detection of canine *Leishmania*-specific cellular immunity. *Vet Parasitol* 1998; 79: 213-20.

Cardoso L, Rodrigues M, Santos H, Schoone GJ, Carreta P, Varejao E, van Benthem B, Afonso MO, Alves-Pires C, Semiao-Santos SJ, Rodrigues J, Schallig HD. Sero-epidemiological study of canine *Leishmania* spp. infection in the municipality of Alijo (Alto Douro, Portugal). *Vet Parasitol* 2004; 121: 21-32.

Center for Disease Control and Prevention, *Leishmania* Lifecycle. http://www.cdc.gov/parasites/images/leishmaniasis/Leishmania_LifeCycle.gif.

Chulay JD, Bryceson AD. Quantitation of amastigotes of *Leishmania donovani* in smears of splenic aspirates from patients with visceral leishmaniasis. *Am J Trop Med Hyg* 1983; 32: 475-9.

Ciaramella P, Oliva G, Luna RD, Gradoni L, Ambrosio R, Cortese L, Scalone A, Persechino A. A retrospective clinical study of canine leishmaniasis in 150 dogs naturally infected by *Leishmania infantum*. *Vet Rec* 1997; 141: 539-43.

Ciaramella P, Pelagalli A, Cortese L, Pero ME, Corona M, Lombardi P, Avallone

L, Persechino A. Altered platelet aggregation and coagulation disorders related to clinical findings in 30 dogs naturally infected by *Leishmania infantum*. *Vet J* 2005; 169: 465-7.

Colombo FA, Odorizzi RM, Laurenti MD, Galati EA, Canavez F, Pereira-Chioccolla VL. Detection of *Leishmania (Leishmania) infantum* RNA in fleas and ticks collected from naturally infected dogs. *Parasitol Res* 2011; 109: 267-74.

Cortadellas O, Fernandez del Palacio MJ, Talavera J, Bayon A. Glomerular filtration rate in dogs with leishmaniasis and chronic kidney disease. *J Vet Intern Med* 2008; 22: 293-300.

Cortese L, Sica M, Piantedosi D, Ruggiero G, Pero ME, Terrazzano G, Mastellone V, Ciaramella P. Secondary immune-mediated thrombocytopenia in dogs naturally infected by *Leishmania infantum*. *Vet Rec* 2009; 164: 778-82.

Costa FA, Goto H, Saldanha LC, Silva SM, Sinhorini IL, Silva TC, Guerra JL. Histopathologic patterns of nephropathy in naturally acquired canine visceral leishmaniasis. *Vet Pathol* 2003; 40: 677-84.

Costa FA, Prianti MG, Silva TC, Silva SM, Guerra JL, Goto H. T cells, adhesion molecules and modulation of apoptosis in visceral leishmaniasis glomerulonephritis. *BMC infectious diseases* 2010; 10: 112.

Coutinho MT, Bueno LL, Sterzik A, Fujiwara RT, Botelho JR, De Maria M, Genaro O, Linardi PM. Participation of *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) in the epidemiology of canine visceral leishmaniasis. *Vet Parasitol* 2005; 128: 149-55.

Coutinho MT, Linardi PM. Can fleas from dogs infected with canine visceral leishmaniasis transfer the infection to other mammals? *Vet Parasitol* 2007; 147: 320-5.

Dantas-Torres F. The role of dogs as reservoirs of *Leishmania* parasites, with emphasis on *Leishmania* (*Leishmania*) *infantum* and *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis*. *Vet Parasitol* 2007; 149: 139-46.

Day MJ. Immunoglobulin G subclass distribution in canine leishmaniosis: a review and analysis of pitfalls in interpretation. *Vet Parasitol* 2007; 147: 2-8.

De Almeida Ferreira S, Leite RS, Ituassu LT, Almeida GG, Souza DM, Fujiwara RT, de Andrade AS, Melo MN. Canine skin and conjunctival swab samples for the detection and quantification of *Leishmania infantum* DNA in an endemic urban area in Brazil. *PLoS neglected tropical diseases* 2012; 6: e1596.

De Freitas E, Melo MN, da Costa-Val AP, Michalick MS. Transmission of *Leishmania infantum* via blood transfusion in dogs: potential for infection and importance of clinical factors. *Vet Parasitol* 2006; 137: 159-67.

De Freitas JC, Lopes-Neto BE, de Abreu CR, Coura-Vital W, Braga SL, Reis AB, Nunes-Pinheiro DC. Profile of anti-*Leishmania* antibodies related to clinical picture in canine visceral leishmaniasis. *Res Vet Sci* 2012; 93: 705-9.

Denerolle P, Bourdoiseau G. Combination allopurinol and antimony treatment versus antimony alone and allopurinol alone in the treatment of canine leishmaniasis (96 cases). *J Vet Intern Med* 1999; 13: 413-5.

Deplazes P, Smith NC, Arnold P, Lutz H, Eckert J. Specific IgG1 and IgG2 antibody responses of dogs to *Leishmania infantum* and other parasites. *Parasite Immunol* 1995; 17: 451-8.

Di Muccio T, Veronesi F, Antognoni MT, Onofri A, Piergili Fioretti D, Gramiccia M. Diagnostic value of conjunctival swab sampling associated with nested PCR for different categories of dogs naturally exposed to *Leishmania infantum* infection. *J Clin Microbiol* 2012; 50: 2651-9.

Diaz-Espineira MM, Slappendel RJ. A case of autochthonous canine leishmaniasis in The Netherlands. *Vet Q* 1997; 19: 69-71.

Duprey ZH, Steurer FJ, Rooney JA, Kirchhoff LV, Jackson JE, Rowton ED, Schantz PM. Canine visceral leishmaniasis, United States and Canada, 2000-2003. *Emerg Infect Dis* 2006; 12: 440-6.

Eddlestone SM, Diniz PP, Neer TM, Gaunt SD, Corstvet R, Cho D, Hosgood G, Hegarty B, Breitschwerdt EB. Doxycycline clearance of experimentally induced chronic *Ehrlichia canis* infection in dogs. *J Vet Intern Med* 2007; 21: 1237-42.

Fernandez-Bellon H, Solano-Gallego L, Rodriguez A, Rutten VP, Hoek A, Ramis A, Alberola J, Ferrer L. Comparison of three assays for the evaluation of specific cellular immunity to *Leishmania infantum* in dogs. *Vet Immunol Immunopathol* 2005; 107: 163-9.

Fernandez-Perez FJ, Gomez-Munoz MT, Mendez S, Alunda JM. Leishmania-specific lymphoproliferative responses and IgG1/IgG2 immunodetection patterns by Western blot in asymptomatic, symptomatic and treated dogs. *Acta Trop* 2003; 86: 83-91.

Ferreira Ede C, de Lana M, Carneiro M, Reis AB, Paes DV, da Silva ES, Schallig H, Gontijo CM. Comparison of serological assays for the diagnosis of canine visceral leishmaniasis in animals presenting different clinical manifestations. *Vet Parasitol* 2007; 146: 235-41.

Ferreira Sde A, Ituassu LT, de Melo MN, de Andrade AS. Evaluation of the conjunctival swab for canine visceral leishmaniasis diagnosis by PCR-hybridization in Minas Gerais State, Brazil. *Vet Parasitol* 2008; 152: 257-63.

Ferrer L, Aisa MJ, Roura X, Portus M. Serological diagnosis and treatment of canine leishmaniasis. *Vet Rec* 1995; 136: 514-6.

Ferroglio E, Centaro E, Mignone W, Trisciuglio A. Evaluation of an ELISA rapid device for the serological diagnosis of *Leishmania infantum* infection in dog as compared with immunofluorescence assay and Western blot. *Vet Parasitol* 2007; 144: 162-6.

Fisa R, Gallego M, Riera C, Aisa MJ, Valls D, Serra T, de Colmenares M, Castillejo S, Portus M. Serologic diagnosis of canine leishmaniasis by dot-ELISA. *J Vet Diagn Invest* 1997; 9: 50-5.

Fisa R, Riera C, Gallego M, Manubens J, Portus M. Nested PCR for diagnosis of canine leishmaniosis in peripheral blood, lymph node and bone marrow aspirates. *Vet Parasitol* 2001; 99: 105-11.

Foglia Manzillo V, Restucci B, Pagano A, Gradoni L, Oliva G. Pathological changes in the bone marrow of dogs with leishmaniosis. *Vet Rec* 2006; 158: 690-4.

Franca-Silva JC, da Costa RT, Siqueira AM, Machado-Coelho GL, da Costa CA, Mayrink W, Vieira EP, Costa JS, Genaro O, Nascimento E. Epidemiology of canine visceral leishmaniosis in the endemic area of Montes Claros Municipality, Minas Gerais State, Brazil. *Vet Parasitol* 2003; 111: 161-73.

Franceschi A, Merildi V, Guidi G, Mancianti F. Occurrence of *Leishmania* DNA in urines of dogs naturally infected with leishmaniasis. *Vet Res Commun* 2007; 31: 335-41.

Francino O, Altet L, Sanchez-Robert E, Rodriguez A, Solano-Gallego L, Alberola J, Ferrer L, Sanchez A, Roura X. Advantages of real-time PCR assay for diagnosis and monitoring of canine leishmaniosis. *Vet Parasitol* 2006; 137: 214-21.

Freitas JC, Nunes-Pinheiro DC, Lopes Neto BE, Santos GJ, Abreu CR, Braga RR, Campos Rde M, Oliveira LF. Clinical and laboratory alterations in dogs naturally infected by *Leishmania chagasi*. *Rev Soc Bras Med Trop* 2012; 45: 24-9.

Giunchetti RC, Mayrink W, Genaro O, Carneiro CM, Correa-Oliveira R, Martins-Filho OA, Marques MJ, Tafuri WL, Reis AB. Relationship between canine visceral leishmaniosis and the *Leishmania (Leishmania) chagasi* burden in dermal inflammatory foci. *J Comp Pathol* 2006; 135: 100-7.

Gomes YM, Paiva Cavalcanti M, Lira RA, Abath FG, Alves LC. Diagnosis of canine visceral leishmaniasis: biotechnological advances. *Vet J* 2008; 175: 45-52.

Gramiccia M, Gradoni L. The current status of zoonotic leishmaniasis and approaches to disease control. *Int J Parasitol* 2005; 35: 1169-80.

Guerra LL, Teixeira-Carvalho A, Giunchetti RC, Martins-Filho OA, Reis AB, Correa-Oliveira R. Evaluation of the influence of tissue parasite density on hematological and phenotypic cellular parameters of circulating leukocytes and splenocytes during ongoing canine visceral leishmaniasis. *Parasitol Res* 2009; 104: 611-22.

Holzmuller P, Bras-Goncalves R, Lemesre JL. Phenotypical characteristics, biochemical pathways, molecular targets and putative role of nitric oxide-mediated programmed cell death in *Leishmania*. *Parasitology* 2006; 132 Suppl: S19-32.

Iniesta L, Gallego M, Portus M. Immunoglobulin G and E responses in various stages of canine leishmaniosis. *Vet Immunol Immunopathol* 2005; 103: 77-81.

Jose FF, da Silva IM, Araujo MI, Almeida RP, Bacellar O, Carvalho EM. Evaluation of the sensitization power of Montenegro skin test. *Rev Soc Bras Med Trop* 2001; 34: 537-42.

Killick-Kendrick R, Leaney AJ, Ready PD, Molyneux DH. *Leishmania* in phlebotomid sandflies. IV. The transmission of *Leishmania mexicana amazonensis* to hamsters by the bite of experimentally infected *Lutzomyia longipalpis*. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B, Royal Society* 1977; 196: 105-15.

Killick-Kendrick R. Some epidemiological consequences of the evolutionary fit between *Leishmaniae* and their phlebotomine vectors. *Bull Soc Pathol Exot Filiales* 1985; 78: 747-55.

Killick-Kendrick R. The biology and control of phlebotomine sand flies. *Clin Dermatol* 1999; 17: 279-89.

Koutinas AF, Polizopoulou ZS, Saridomichelakis MN, Argyriadis D, Fytianou A, Plevraki KG. Clinical considerations on canine visceral leishmaniasis in Greece: a retrospective study of 158 cases (1989-1996). *J Am Anim Hosp Assoc* 1999; 35: 376-83.

Lachaud L, Chabbert E, Dubessay P, Dereure J, Lamothe J, Dedet JP, Bastien P. Value of two PCR methods for the diagnosis of canine visceral leishmaniasis and the detection of asymptomatic carriers. *Parasitology* 2002a; 125: 197-207.

Lachaud L, Marchergui-Hammami S, Chabbert E, Dereure J, Dedet JP, Bastien P. Comparison of six PCR methods using peripheral blood for detection of canine visceral leishmaniasis. *J Clin Microbiol* 2002b; 40: 210-5.

Lage RS, Oliveira GC, Busek SU, Guerra LL, Giunchetti RC, Correa-Oliveira R, Reis AB. Analysis of the cytokine profile in spleen cells from dogs naturally infected by *Leishmania chagasi*. *Vet Immunol Immunopathol* 2007; 115: 135-45.

Lai CC, You JF, Yeh CY, Chen JS, Tang R, Wang JY, Chin CC. Low preoperative serum albumin in colon cancer: a risk factor for poor outcome. *Int J Colorectal Dis* 2011; 26: 473-81.

Leandro C, Santos-Gomes GM, Campino L, Romao P, Cortes S, Rolao N, Gomes-Pereira S, Rica Capela MJ, Abranches P. Cell mediated immunity and specific IgG1 and IgG2 antibody response in natural and experimental canine leishmaniosis. *Vet Immunol Immunopathol* 2001; 79: 273-84.

Lees GE, Brown SA, Elliott J, Grauer GE, Vaden SL. Assessment and management of proteinuria in dogs and cats: 2004 ACVIM Forum Consensus Statement (Small Animal). *J Vet Intern Med* 2005; 19: 377-85.

Leite RS, Ferreira Sde A, Ituassu LT, de Melo MN, de Andrade AS. PCR diagnosis of visceral leishmaniasis in asymptomatic dogs using conjunctival swab samples. *Vet Parasitol* 2010; 170: 201-6.

Leontides LS, Saridomichelakis MN, Billinis C, Kontos V, Koutinas AF, Galatos AD, Mylonakis ME. A cross-sectional study of *Leishmania* spp. infection in clinically healthy dogs with polymerase chain reaction and serology in Greece. *Vet Parasitol* 2002; 109: 19-27.

Lima WG, Michalick MS, de Melo MN, Luiz Tafuri W, Luiz Tafuri W. Canine visceral leishmaniasis: a histopathological study of lymph nodes. *Acta Trop* 2004; 92: 43-53.

Liu D, Uzonna JE. The early interaction of *Leishmania* with macrophages and dendritic cells and its influence on the host immune response. *Front Cell Infect Microbiol* 2012; 2: 83.

Lombardo G, Pennisi MG, Lupo T, Migliazzo A, Capri A, Solano-Gallego L. Detection of *Leishmania infantum* DNA by real-time PCR in canine oral and conjunctival swabs and comparison with other diagnostic techniques. *Vet Parasitol* 2012; 184: 10-7.

Lucena R, Ginel PJ. Immunoglobulin isotype distribution of antinuclear antibodies in dogs with leishmaniasis. *Res Vet Sci* 1998; 65: 205-7.

Maia C, Ramada J, Cristovao JM, Goncalves L, Campino L. Diagnosis of canine leishmaniasis: conventional and molecular techniques using different tissues. *Vet J* 2007; 179: 142-4.

Maia C, Campino L. Methods for diagnosis of canine leishmaniasis and immune response to infection. *Vet Parasitol* 2008; 158: 274-87.

Manna L, Vitale F, Reale S, Caracappa S, Pavone LM, Morte RD, Cringoli G, Staiano N, Gravino AE. Comparison of different tissue sampling for PCR-based diagnosis and follow-up of canine visceral leishmaniosis. *Vet Parasitol* 2004; 125: 251-62.

Manna L, Reale S, Vitale F, Picillo E, Pavone LM, Gravino AE. Real-time PCR assay in *Leishmania*-infected dogs treated with meglumine antimoniate and allopurinol. *Vet J* 2008; 177: 279-82.

Martinez-Subiela S, Strauss-Ayali D, Ceron JJ, Baneth G. Acute phase protein response in experimental canine leishmaniasis. *Vet Parasitol* 2011; 180: 197-202.

Mettler M, Grimm F, Capelli G, Camp H, Deplazes P. Evaluation of enzyme-linked immunosorbent assays, an immunofluorescent-antibody test, and two rapid tests (immunochromatographic-dipstick and gel tests) for serological diagnosis of symptomatic and asymptomatic *Leishmania* infections in dogs. *J Clin Microbiol* 2005a; 43: 5515-9.

Mettler M, Grimm F, Naucke TJ, Maasjost C, Deplazes P. Canine leishmaniosis in Central Europe: retrospective survey and serological study of imported and travelling dogs. *Berl Munch Tierarztl Wochenschr* 2005b; 118: 37-44.

Moreira MA, Luvizotto MC, Garcia JF, Corbett CE, Laurenti MD. Comparison of parasitological, immunological and molecular methods for the diagnosis of leishmaniasis in dogs with different clinical signs. *Vet Parasitol* 2007; 145: 245-52.

Moreno J, Nieto J, Chamizo C, Gonzalez F, Blanco F, Barker DC, Alva J. The immune response and PBMC subsets in canine visceral leishmaniasis before, and after, chemotherapy. *Vet Immunol Immunopathol* 1999; 71: 181-95.

Moreno J, Alvar J. Canine leishmaniasis: epidemiological risk and the experimental model. *Trends Parasitol* 2002; 18: 399-405.

Murray HW, Berman JD, Davies CR, Saravia NG. Advances in leishmaniasis. *Lancet* 2005; 366: 1561-77.

Mylonakis ME, Papaioannou N, Saridomichelakis MN, Koutinas AF, Billinis C, Kontos VI. Cytologic patterns of lymphadenopathy in dogs infected with *Leishmania infantum*. *Vet Clin Pathol* 2005; 34: 243-7.

Nascimento MD, Alcantara-Neves NM, Muniz ME, Nunes SF, Paranhos M, de Carvalho LC. Induction and modulation of the immune response to *Leishmania* by Montenegro's skin test. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1993; 87: 91-3.

Naucke TJ, Pesson B. Presence of *Phlebotomus* (*Transphlebotomus*) *mascittii* Grassi, 1908 (Diptera : Psychodidae) in Germany. *Parasitol Res* 2000; 86: 335-6.

Naucke TJ, Lorentz S. First report of venereal and vertical transmission of canine leishmaniosis from naturally infected dogs in Germany. *Parasit Vectors* 2012; 5: 67.

Nicolas L, Prina E, Lang T, Milon G. Real-time PCR for detection and quantitation of leishmania in mouse tissues. *J Clin Microbiol* 2002; 40: 1666-9.

Noli C, Auxilia ST. Treatment of canine Old World visceral leishmaniasis: a systematic review. *Vet Dermatol* 2005; 16: 213-32.

Oliva G, Scalone A, Foglia Manzillo V, Gramiccia M, Pagano A, Di Muccio T, Gradoni L. Incidence and time course of *Leishmania infantum* infections examined by parasitological, serologic, and nested-PCR techniques in a cohort of naive dogs exposed to three consecutive transmission seasons. *J Clin Microbiol* 2006; 44: 1318-22.

Oliva G, Dvm XR, Crotti A, Maroli M, Castagnaro M, Gradoni L, Lubas G, Paltrinieri S, Zatelli A, Zini E. Guidelines for treatment of leishmaniasis in dogs. J Am Vet Med Assoc 2010; 236: 1192-8.

Ordeix L, Solano-Gallego L, Fondevila D, Ferrer L, Fondati A. Papular dermatitis due to *Leishmania* spp. infection in dogs with parasite-specific cellular immune responses. Vet Dermatol 2005; 16: 187-91.

Paltrinieri S, Solano-Gallego L, Fondati A, Lubas G, Gradoni L, Castagnaro M, Crotti A, Maroli M, Oliva G, Roura X, Zatelli A, Zini E. Guidelines for diagnosis and clinical classification of leishmaniasis in dogs. J Am Vet Med Assoc 2010; 236: 1184-91.

Papadogiannakis EI, Koutinas AF, Saridomichelakis MN, Vlemmas J, Lekkas S, Karameris A, Fytianou A. Cellular immunophenotyping of exfoliative dermatitis in canine leishmaniosis (*Leishmania infantum*). Vet Immunol Immunopathol 2005; 104: 227-37.

Pearson RD, Sousa AQ. Clinical spectrum of Leishmaniasis. Clin Infect Dis 1996; 22: 1-13.

Pennisi MG, Reale S, Giudice SL, Masucci M, Caracappa S, Vitale M, Vitale F. Real-time PCR in dogs treated for leishmaniasis with allopurinol. Vet Res Commun 2005; 29 Suppl 2: 301-3.

Petanides TA, Koutinas AF, Mylonakis ME, Day MJ, Saridomichelakis MN, Leontides LS, Mischke R, Diniz P, Breitschwerdt EB, Kritsepi M, Garipidou VA, Koutinas CK, Lekkas S. Factors associated with the occurrence of epistaxis in natural canine leishmaniasis (*Leishmania infantum*). J Vet Intern Med 2008; 22: 866-72.

Pilatti MM, Ferreira Sde A, de Melo MN, de Andrade AS. Comparison of PCR methods for diagnosis of canine visceral leishmaniasis in conjunctival swab samples. Res Vet Sci 2009; 87: 255-7.

Pinelli E, Killick-Kendrick R, Wagenaar J, Bernadina W, del Real G, Ruitenbergh J. Cellular and humoral immune responses in dogs experimentally and naturally infected with *Leishmania infantum*. *Infect Immun* 1994; 62: 229-35.

Pinelli E, Gonzalo RM, Boog CJ, Rutten VP, Gebhard D, del Real G, Ruitenbergh EJ. *Leishmania infantum*-specific T cell lines derived from asymptomatic dogs that lyse infected macrophages in a major histocompatibility complex-restricted manner. *Eur J Immunol* 1995; 25: 1594-600.

Pinelli E, van der Kaaij SY, Slappendel R, Fragio C, Ruitenbergh EJ, Bernadina W, Rutten VP. Detection of canine cytokine gene expression by reverse transcription-polymerase chain reaction. *Vet Immunol Immunopathol* 1999; 69: 121-6.

Pinelli E, Gebhard D, Mommaas AM, van Hoeij M, Langermans JA, Ruitenbergh EJ, Rutten VP. Infection of a canine macrophage cell line with *leishmania infantum*: determination of nitric oxide production and anti-leishmanial activity. *Vet Parasitol* 2000; 92: 181-9.

Plevraki K, Koutinas AF, Kaldrymidou H, Roumpies N, Papazoglou LG, Saridomichelakis MN, Savvas I, Leondides L. Effects of allopurinol treatment on the progression of chronic nephritis in Canine leishmaniasis (*Leishmania infantum*). *J Vet Intern Med* 2006; 20: 228-33.

Poli A, Abramo F, Mancianti F, Nigro M, Pieri S, Bionda A. Renal involvement in canine leishmaniasis. A light-microscopic, immunohistochemical and electron-microscopic study. *Nephron* 1991; 57: 444-52.

Porrozzi R, Santos da Costa MV, Teva A, Falqueto A, Ferreira AL, dos Santos CD, Fernandes AP, Gazzinelli RT, Campos-Neto A, Grimaldi G, Jr. Comparative evaluation of enzyme-linked immunosorbent assays based on crude and recombinant leishmanial antigens for serodiagnosis of symptomatic and asymptomatic *Leishmania infantum* visceral infections in dogs. *Clin Vaccine Immunol*: CVI 2007; 14: 544-8.

Quinnell RJ, Courtenay O, Davidson S, Garcez L, Lambson B, Ramos P, Shaw JJ, Shaw MA, Dye C. Detection of *Leishmania infantum* by PCR, serology and cellular immune response in a cohort study of Brazilian dogs. *Parasitology* 2001; 122: 253-61.

Quinnell RJ, Kennedy LJ, Barnes A, Courtenay O, Dye C, Garcez LM, Shaw MA, Carter SD, Thomson W, Ollier WE. Susceptibility to visceral leishmaniasis in the domestic dog is associated with MHC class II polymorphism. *Immunogenetics* 2003a; 55: 23-8.

Quinnell RJ, Courtenay O, Garcez LM, Kaye PM, Shaw MA, Dye C, Day MJ. IgG subclass responses in a longitudinal study of canine visceral leishmaniasis. *Vet Immunol Immunopathol* 2003b; 91: 161-8.

Reis AB, Teixeira-Carvalho A, Vale AM, Marques MJ, Giunchetti RC, Mayrink W, Guerra LL, Andrade RA, Correa-Oliveira R, Martins-Filho OA. Isotype patterns of immunoglobulins: hallmarks for clinical status and tissue parasite density in Brazilian dogs naturally infected by *Leishmania (Leishmania) chagasi*. *Vet Immunol Immunopathol* 2006a; 112: 102-16.

Reis AB, Martins-Filho OA, Teixeira-Carvalho A, Carvalho MG, Mayrink W, Franca-Silva JC, Giunchetti RC, Genaro O, Correa-Oliveira R. Parasite density and impaired biochemical/hematological status are associated with severe clinical aspects of canine visceral leishmaniasis. *Res Vet Sci* 2006b; 81: 68-75.

Reithinger R, Lambson BE, Barker DC, Counihan H, Espinoza CJ, Gonzalez JS, Davies CR. *Leishmania (Viannia) spp.* dissemination and tissue tropism in naturally infected dogs (*Canis familiaris*). *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2002; 96: 76-8.

Rhalem A, Sahibi H, Guessous-Idrissi N, Lasri S, Natami A, Riyad M, Berrag B. Immune response against *Leishmania* antigens in dogs naturally and experimentally infected with *Leishmania infantum*. *Vet Parasitol* 1999; 81: 173-84.

Rodriguez A, Solano-Gallego L, Ojeda A, Quintana J, Riera C, Gallego M, Portus M, Alberola J. Dynamics of Leishmania-specific immunoglobulin isotypes in dogs with clinical leishmaniasis before and after treatment. *J Vet Intern Med* 2006; 20: 495-8.

Rodriguez-Cortes A, Fernandez-Bellon H, Ramis A, Ferrer L, Alberola J, Solano-Gallego L. Leishmania-specific isotype levels and their relationship with specific cell-mediated immunity parameters in canine leishmaniasis. *Vet Immunol Immunopathol* 2007; 116: 190-8.

Rogers ME, Chance ML, Bates PA. The role of promastigote secretory gel in the origin and transmission of the infective stage of *Leishmania mexicana* by the sandfly *Lutzomyia longipalpis*. *Parasitology* 2002; 124: 495-507.

Rogers ME, Ilg T, Nikolaev AV, Ferguson MA, Bates PA. Transmission of cutaneous leishmaniasis by sand flies is enhanced by regurgitation of fPPG. *Nature* 2004; 430: 463-7.

Rolao N, Cortes S, Rodrigues OR, Campino L. Quantification of *Leishmania infantum* parasites in tissue biopsies by real-time polymerase chain reaction and polymerase chain reaction-enzyme-linked immunosorbent assay. *J Parasitol* 2004; 90: 1150-4.

Rosypal AC, Troy GC, Zajac AM, Frank G, Lindsay DS. Transplacental transmission of a North American isolate of *Leishmania infantum* in an experimentally infected beagle. *J Parasitol* 2005; 91: 970-2.

Sanchez-Robert E, Altet L, Utzet-Sadurni M, Giger U, Sanchez A, Francino O. *Slc11a1* (formerly *Nramp1*) and susceptibility to canine visceral leishmaniasis. *Vet Res* 2008; 39: 36.

Santana CC, Vassallo J, de Freitas LA, Oliveira GG, Pontes-de-Carvalho LC, dos-Santos WL. Inflammation and structural changes of splenic lymphoid tissue in visceral leishmaniasis: a study on naturally infected dogs. *Parasite Immunol* 2008;

30: 515-24.

Saridomichelakis MN, Mylonakis ME, Leontides LS, Koutinas AF, Billinis C, Kontos VI. Evaluation of lymph node and bone marrow cytology in the diagnosis of canine leishmaniasis (*Leishmania infantum*) in symptomatic and asymptomatic dogs. *Am J Trop Med Hyg* 2005; 73: 82-6.

Saridomichelakis MN. Advances in the pathogenesis of canine leishmaniosis: epidemiologic and diagnostic implications. *Vet Dermatol* 2009; 20: 471-89.

Scalone A, De Luna R, Oliva G, Baldi L, Satta G, Vesco G, Mignone W, Turilli C, Mondesire RR, Simpson D, Donoghue AR, Frank GR, Gradoni L. Evaluation of the *Leishmania* recombinant K39 antigen as a diagnostic marker for canine leishmaniasis and validation of a standardized enzyme-linked immunosorbent assay. *Vet Parasitol* 2002; 104: 275-85.

Sideris V, Papadopoulou G, Dotsika E, Karagouni E. Asymptomatic canine leishmaniasis in Greater Athens area, Greece. *European journal of epidemiology* 1999; 15: 271-6.

Silva ES, Gontijo CM, Pirmez C, Fernandes O, Brazil RP. Short report: detection of *Leishmania* DNA by polymerase chain reaction on blood samples from dogs with visceral leishmaniasis. *Am J Trop Med Hyg* 2001; 65: 896-8.

Slappendel RJ. Canine leishmaniasis. A review based on 95 cases in The Netherlands. *Vet Q* 1988; 10: 1-16.

Solano-Gallego L, Llull J, Ramos G, Riera C, Arboix M, Alberola J, Ferrer L. The Ibizian hound presents a predominantly cellular immune response against natural *Leishmania* infection. *Vet Parasitol* 2000; 90: 37-45.

Solano-Gallego L, Llull J, Arboix M, Ferrer L, Alberola J. Evaluation of the efficacy of two leishmanins in asymptomatic dogs. *Vet Parasitol* 2001a; 102: 163-

6.

Solano-Gallego L, Riera C, Roura X, Iniesta L, Gallego M, Valladares JE, Fisa R, Castillejo S, Alberola J, Ferrer L, Arboix M, Portus M. Leishmania infantum-specific IgG, IgG1 and IgG2 antibody responses in healthy and ill dogs from endemic areas. Evolution in the course of infection and after treatment. Vet Parasitol 2001b; 96: 265-76.

Solano-Gallego L, Morell P, Arboix M, Alberola J, Ferrer L. Prevalence of Leishmania infantum infection in dogs living in an area of canine leishmaniasis endemicity using PCR on several tissues and serology. J Clin Microbiol 2001c; 39: 560-3.

Solano-Gallego L, Fernandez-Bellon H, Morell P, Fondevila D, Alberola J, Ramis A, Ferrer L. Histological and immunohistochemical study of clinically normal skin of Leishmania infantum-infected dogs. J Comp Pathol 2004; 130: 7-12.

Solano-Gallego L, Llull J, Ramis A, Fernandez-Bellon H, Rodriguez A, Ferrer L, Alberola J. Longitudinal study of dogs living in an area of Spain highly endemic for leishmaniasis by serologic analysis and the leishmanin skin test. Am J Trop Med Hyg 2005; 72: 815-8.

Solano-Gallego L, Koutinas A, Miro G, Cardoso L, Pennisi MG, Ferrer L, Bourdeau P, Oliva G, Baneth G. Directions for the diagnosis, clinical staging, treatment and prevention of canine leishmaniosis. Vet Parasitol 2009; 165: 1-18.

Solano-Gallego L, Rossi L, Scroccaro AM, Montarsi F, Caldin M, Furlanello T, Trotta M. Detection of Leishmania infantum DNA mainly in Rhipicephalus sanguineus male ticks removed from dogs living in endemic areas of canine leishmaniosis. Parasit Vectors 2012; 5: 98.

Strauss-Ayali D, Jaffe CL, Burshtain O, Gonen L, Baneth G. Polymerase chain reaction using noninvasively obtained samples, for the detection of Leishmania infantum DNA in dogs. J Infect Dis 2004; 189: 1729-33.

Tabar MD, Roura X, Francino O, Altet L, Ruiz de Gopegui R. Detection of *Leishmania infantum* by real-time PCR in a canine blood bank. *J Small Anim Pract* 2008; 49: 325-8.

Tafuri WL, Santos RL, Arantes RM, Goncalves R, de Melo MN, Michalick MS, Tafuri WL. An alternative immunohistochemical method for detecting *Leishmania amastigotes* in paraffin-embedded canine tissues. *J Immunol Methods* 2004; 292: 17-23.

Tanczos B, Balogh N, Kiraly L, Biksi I, Szeredi L, Gyurkovsky M, Scalone A, Fiorentino E, Gramiccia M, Farkas R. First record of autochthonous canine leishmaniasis in hungary. *Vector borne and zoonotic dis* 2012; 12: 588-94.

Terrazzano G, Cortese L, Piantedosi D, Zappacosta S, Di Loria A, Santoro D, Ruggiero G, Ciaramella P. Presence of anti-platelet IgM and IgG antibodies in dogs naturally infected by *Leishmania infantum*. *Vet Immunol Immunopathol* 2006; 110: 331-7.

Tuon FF, Neto VA, Amato VS. *Leishmania*: origin, evolution and future since the Precambrian. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2008; 54: 158-66.

Turco SJ. The leishmanial lipophosphoglycan: a multifunctional molecule. *Exp Parasitol* 1990; 70: 241-5.

Vamvakidis CD, Koutinas AF, Kanakoudis G, Georgiadis G, Saridomichelakis M. Masticatory and skeletal muscle myositis in canine leishmaniasis (*Leishmania infantum*). *Vet Rec* 2000; 146: 698-703.

Vercosa BL, Melo MN, Puerto HL, Mendonca IL, Vasconcelos AC. Apoptosis, inflammatory response and parasite load in skin of *Leishmania* (*Leishmania*) *chagasi* naturally infected dogs: A histomorphometric analysis. *Vet Parasitol* 2012;

Vitale F, Reale S, Vitale M, Petrotta E, Torina A, Caracappa S. TaqMan-based detection of *Leishmania infantum* DNA using canine samples. *Ann N Y Acad Sci* 2004; 1026: 139-43.

Volf P, Hostomska J, Rohousova I. Molecular crosstalks in *Leishmania*-sandfly-host relationships. *Parasite* 2008; 15: 237-43.

Vouldoukis I, Drapier JC, Nussler AK, Tselentis Y, Da Silva OA, Gentilini M, Mossalayi DM, Monjour L, Dugas B. Canine visceral leishmaniasis: successful chemotherapy induces macrophage antileishmanial activity via the L-arginine nitric oxide pathway. *Antimicrob Agents Chemother* 1996; 40: 253-6.

Weinkle TK, Center SA, Randolph JF, Warner KL, Barr SC, Erb HN. Evaluation of prognostic factors, survival rates, and treatment protocols for immune-mediated hemolytic anemia in dogs: 151 cases (1993-2002). *J Am Vet Med Assoc* 2005; 226: 1869-80.

Whittemore JC, Marcum BA, Mawby DI, Coleman MV, Hacket TB, Lappin MR. Associations among albuminuria, C-reactive protein concentrations, survival predictor index scores, and survival in 78 critically ill dogs. *J Vet Intern Med* 2011; 25: 818-24.

Xavier SC, de Andrade HM, Monte SJ, Chiarelli IM, Lima WG, Michalick MS, Tafuri WL, Tafuri WL. Comparison of paraffin-embedded skin biopsies from different anatomical regions as sampling methods for detection of *Leishmania* infection in dogs using histological, immunohistochemical and PCR methods. *BMC Vet Res* 2006; 2: 17.

Zatelli A, Borgarelli M, Santilli R, Bonfanti U, Nigrisoli E, Zanatta R, Tarducci A, Guarraci A. Glomerular lesions in dogs infected with *Leishmania* organisms. *Am J Vet Res* 2003; 64: 558-61

IX. DANKSAGUNG

Sehr herzlich möchte ich mich bei **Frau Univ.-Prof. Dr. Katrin Hartmann** bedanken, die mir ein so faszinierendes Dissertationsthema gestellt und mir damit die wunderbare Welt der Internistik eröffnet hat. Ich danke ihr ganz besonders für ihren unermüdlichen Einsatz, für die zahlreichen hilfreichen Anregungen und vor allem dafür, dass sie an mich geglaubt hat.

An dieser Stelle auch vielen Dank an **Frau Dr. Karin Weber** für ihre große Hilfestellung und Geduld während der Isolation meiner Proben und der anschließenden Validierung des PCR-Protokolls und an **Frau Dr. Carola Sauter-Louis** für ihre Unterstützung bei der statistischen Auswertung.

Bedanken möchte ich mich auch bei **Herrn Univ.-Prof. Dr. Ralph Müller** für seinen fachlichen Rat bei der Interpretation meiner Daten und bei seinem **Team**, dafür, dass sie bei jedem Patienten mit Leishmaniose Verdacht an mich gedacht haben.

Vielen Dank an die Tierschutzorganisationen „**Lega Pro Animale**“ und „**Galgos in Not**“ für die Unterstützung während des Sammelns der Proben.

Von ganzem Herzen möchte ich mich bei meinen **Eltern** bedanken, ohne deren bedingungslose Unterstützung sowohl mein Studium als auch meine Doktorarbeit nicht möglich gewesen wären. Sie haben nie an mir gezweifelt und mich immer bestärkt, meinen Weg zu gehen. Ganz besonderen Dank meiner **Mama** für das unermüdliche Korrekturlesen meiner Arbeit und meinem **Papa** für seinen unbändigen Wissenshunger und die guten Gespräche während des Verfassens dieser Arbeit.

Besonderer Dank gilt auch meinem Freund **Oliver**, der immer für mich da war. Er hat mich immer motiviert, in schwierigen Phasen die Welt wieder in Ordnung gebracht, und dafür gesorgt, dass ich den Blick auf das Wesentliche im Leben nicht verliere.

Zum Schluss möchte ich noch bei all meinen **Freunden** und **Kollegen** danken, die mich immer unterstützt und wenn nötig, aufgemuntert haben.